



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2011

Gabriela Maria Pereira Avaliação da Funcionalidade Mitocondrial na
Carvalho Guerra Cardiomiopatia Diabética



Gabriela Maria Pereira Avaliação da Funcionalidade Mitocondrial na
Carvalho Guerra Cardiomiopatia Diabética

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Mestrado em Bioquímica-Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família, ao Nuno e a todos os que me apoiaram durante esta jornada.

o júri

presidente

Prof. Doutor Mário Manuel Quialheiro Simões
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor António Alexandre Moreira Ribeiro de Ascensão
professor auxiliar da Faculdade de Desporto da Universidade do Porto

Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof. Doutora Rita Ferreira e Prof. Doutora Maria do Rosário Domingues, gostaria de agradecer pela incansável orientação científica, pela disponibilidade e pelas críticas construtivas que me permitiram melhorar e enriquecer a minha prática e os meus conhecimentos científicos.

Ao Doutor Rui Vitorino gostaria de agradecer a disponibilidade para auxiliar nas mais diversas ocasiões, assim como a paciência e a confiança depositada em mim durante a execução do trabalho laboratorial.

Gostaria também de agradecer à Ana Isabel pelo apoio e ajuda prestada nos primeiros trabalhos laboratoriais realizados, ao Renato, à Cláudia e à Beta pelo apoio e pela ajuda prestada.

À Cristina gostaria de agradecer pelo seu acompanhamento, pela sua ajuda, incentivo, simpatia e boa disposição.

Às minhas amigas de mestrado gostaria de deixar o meu sincero apreço e carinho por todo o apoio e incentivo durante estes anos de mestrado. Conhecer-las e tê-las como amigas foi sem dúvida uma das melhores coisas que me podia ter acontecido durante o mestrado. Obrigada “filhotas”.

Aos meus colegas e às minhas colegas de mestrado gostaria de agradecer por todos os bons momentos de convívio dentro e fora do laboratório. Foram esses momentos que tornaram o ambiente do laboratório mais alegre e prazeroso.

Em último, gostaria de agradecer ao Nuno pelo apoio, carinho e incentivo em me aventurar por Aveiro. E gostaria de agradecer aos meus pais e às minhas irmãs pelo incansável apoio, pelo carinho e por serem o meu pilar durante os bons e os maus momentos da minha vida. O meu sincero obrigado.

palavras-chave

Cardiomiopatia Diabética, Diabetes *Mellitus* Tipo 1, Mitocôndria, Proteômica, Lipidômica

resumo

A cardiomiopatia diabética é uma das complicações mais comuns da diabetes *mellitus*, sendo a principal causa de insuficiência cardíaca entre os pacientes diabéticos. Nesta patologia está subjacente a disfunção mitocondrial e, dada a importante função da mitocôndria no metabolismo, esta constitui um foco de interesse e de estudo no âmbito da diabetes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a funcionalidade mitocondrial cardíaca numa fase inicial da patogênese da diabetes e a sua possível relação com a suscetibilidade das proteínas e dos lípidos à oxidação. Nesse sentido, utilizou-se um modelo animal de diabetes tipo 1 obtido por administração de streptozotocina (STZ). Após um mês da administração deste fármaco (DMT1) ou de veículo (CONT), os animais foram sacrificados e isolou-se a fração mitocondrial do músculo cardíaco. Posteriormente foi avaliado o efeito da administração de STZ na atividade da cadeia respiratória mitocondrial e na suscetibilidade das proteínas e lípidos mitocondriais ao dano oxidativo e as possíveis alterações estruturais. Os resultados obtidos evidenciaram uma diminuição significativa da atividade dos complexos IV e V da cadeia respiratória do músculo cardíaco dos animais DMT1, determinada *in-gel* após separação dos complexos por BN-PAGE. Concomitantemente, observou-se um aumento do teor de proteínas mitocondriais carboniladas e nitradas avaliadas por *slot-blot*. Observou-se também um aumento do teor relativo das cardiolipinas (CL), das fosfatidilcolinas (PC) e das fosfatidiletanolaminas (PE), avaliado por TLC, nos animais DMT1 relativamente aos animais CONT. A análise efetuada por ESI-MS e ESI-MS/MS evidenciou uma predominância de fosfolípidos contendo ácidos gordos polinsaturados (C20:4, C22:4, C22:5 e C22:6), tendo-se observado, uma alteração da abundância relativa dos fosfolípidos das classes PC e PE correspondentes às espécies moleculares com o ácido gordo C20:4 na sua composição, nos ratos com diabetes *mellitus* tipo 1. Não foram ainda observadas evidências claras de oxidação lipídica.

A análise integrada dos resultados sugere que as alterações do perfil lipídico e a maior suscetibilidade das proteínas mitocondriais à oxidação, observadas apenas 4 semanas após a administração de STZ, poderão ser fatores determinantes para a disfunção mitocondrial e, consequentemente, para a patogênese da cardiomiopatia diabética.

keywords

Diabetic Cardiomyopathy, Type1 Diabetes *Mellitus*, Mitochondria, Proteomics, Lipidomics

abstract

Cardiomyopathy is one of the most common complications of diabetes *mellitus*, being the leading cause of heart failure among diabetic patients. Underlying this pathology is mitochondrial dysfunction and, given the role of mitochondria in cell metabolism, the study of mitochondrial plasticity is a focus of interest in the study of diabetes. Thus, this work aimed to evaluate the cardiac mitochondrial functional alterations in the early phase of diabetes' pathogenesis and its potential relationship with the susceptibility of mitochondrial proteins and lipids to oxidation. In this sense, we used an animal model of type 1 diabetes obtained by administration of streptozotocin (STZ). After one month of STZ administration (DMT1) or vehicle (CONT), animals were sacrificed and the mitochondrial fraction of heart muscle was isolated for the study of mitochondrial functionality and the susceptibility of mitochondrial lipids and proteins to oxidative damage

The results showed a significant decrease in the activity of respiratory chain complexes IV and V after its separation by BN-PAGE. Concomitantly, we observed an increased level of carbonylated and nitrated mitochondrial proteins measured by slot-blot. It was also observed an increase in the relative content of cardiolipin (CL), phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE), evaluated by TLC, in DMT1 relatively to CONT animals. The analysis carried out by ESI-MS and ESI-MS/MS showed a predominance of phospholipids containing polyunsaturated fatty acids (C20: 4, C22: 4, C22: 5 and C22: 6), noting a change in the relative abundance of phospholipids classes PC and PE with fatty acid C20:4 in their composition, related with diabetes *mellitus* type 1. There was also no evidence of lipid oxidation.

In overall, data suggest that the changes in the mitochondria lipid profile and the higher susceptibility of mitochondrial proteins to oxidation, observed only after 4 weeks of STZ administration may be determinant for mitochondrial dysfunction and consequently to the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVIII
ÍNDICE DE TABELAS	XXII
ABREVIATURAS	XXIII
INTRODUÇÃO.....	1
1. Cardiomiopatia Diabética.....	5
2. Mitocôndria: Função e Composição Molecular.....	6
2.1. Importância da Cardiolipina na Patofisiologia da Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	8
2.2. Efeito da Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1 na Fosforilação Oxidativa	11
2.3. Formação de ROS na Mitocôndria.....	12
2.3.1. Nitração: Produção e Efeito do Óxido Nítrico na Mitocôndria.....	14
2.3.2. Carbonilações: Produção e Efeitos	15
3. Aplicação da Espectrometria de Massa no Estudo da Cardiomiopatia Diabética ...	17
3.1. Fontes de Ionização	18
3.2. Tipos de Analisadores.....	19
3.3. Detetores.....	21
3.4. Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS)	21
3.5. Aplicação da Espectrometria de Massa no Estudo de Proteínas e Lípidos	22
4. Objetivos do Estudo.....	26
MATERIAL E MÉTODOS	27
1. Desenho Experimental.....	29
2. Protocolo Animal.....	30
3. Isolamento de Mitocôndrias do Músculo Cardíaco	30
4. Quantificação da Proteína Total pelo Método RC DC (Bio Rad)	31
5. Determinação do Teor de DNA Mitocondrial	31
6. Avaliação da Atividade da Citrato Sintase	31
7. Separação dos Complexos da Cadeia Respiratória por BN-PAGE.....	31

8. Avaliação da Atividade <i>in-gel</i> dos Complexo IV e V da Cadeia Respiratória Mitochondrial	32
9. Avaliação Espectrofotométrica da Atividade do Complexo III da Cadeia Respiratória Mitochondrial	33
10. Determinação do Teor de Proteínas Mitochondriais Nitradas e Carboniladas por Slot-Blot.....	33
11. Extração de Lípidos das Membranas Mitochondriais	34
12. Separação de Lípidos por TLC-1D	35
13. Determinação Quantitativa de Fosfolípidos.....	35
14. Análise e Identificação de Lípidos por Espectrometria de Massa	36
15. Análise Estatística	36
RESULTADOS	37
1. Caracterização do Modelo Animal Utilizado de Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	39
2. Avaliação da Plasticidade da Cadeia Respiratória Mitochondrial	41
3. Avaliação do Perfil Lipídico Mitochondrial do Músculo Cardíaco na Diabetes <i>Mellitus</i> Tipo 1	43
3.1. Separação por TLC e Quantificação de Classes de Fosfolípidos	43
3.2. Análise das Classes de Fosfolípidos por Espectrometria de Massa.....	45
3.2.1. Análise de Espectros de MS no Modo Negativo.....	45
3.2.1.1. Cardiolipina	45
3.2.1.2. Glicerofosfatidilglicerol	49
3.2.1.3. Glicerofosfatidilinositol	52
3.2.2. Análise de Espectros de MS no Modo Positivo	56
3.2.2.1. Glicerofosfatidilcolina	56
3.2.2.2. Glicerofosfatidiletanolamina	61
3.2.2.3. Esfingomielina.....	65
DISCUSSÃO.....	69
CONCLUSÃO	77

BIBLIOGRAFIA.....	81
-------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Alteração do metabolismo das células do músculo cardíaco na diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 (setas a tracejado indicam as vias metabólicas comprometidas). Adaptado de [6].	4
Figura 2 - Ilustração esquemática da mitocôndria, dando ênfase à presença da membrana mitocondrial interna, à membrana mitocondrial externa e aos complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial. Adaptado de [25, 26].	7
Figura 3 – Exemplos de estruturas químicas de alguns fosfolípidos, como por exemplo, fosfatidilglicerol (A), fosfatidilserina (B), fosfatidiletanolamina (C) e fosfatidilcolina (D). Adaptado de [28].	8
Figura 4 – Estrutura da cardiolipina com os diferentes grupos que a constituem. Adaptado de [35].	10
Figura 5 – Cadeia respiratória mitocondrial. Os complexos proteicos transmembranares da cadeia transportadora de elétrons criam um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna necessário para a formação de ATP pela ATP sintase. Adaptado de [24].	11
Figura 6 – Representação dos possíveis fatores indutores da apoptose. Adaptado de [40].	13
Figura 7 – Possíveis reações do NO na membrana mitocondrial interna (I: complexo I, II: complexo II, III: complexo III, IV: complexo IV, V: complexo V, Q: ubisemiquinona, Cyt c: citocromo c, NO: óxido nítrico, O ₂ [•] : anião superóxido). Adaptado de [46, 49].	15
Figura 8 – Possíveis origens dos derivados carbonilados de proteínas. Nas caixas verdes encontram-se descritos os processos das reações “primárias de carbonilação de proteínas” enquanto nas caixas laranja encontram-se descritos os processos das reações “secundárias de carbonilação de proteínas”. Adaptado de [45].	16
Figura 9 – Esquema representativo das várias componentes de um espectrômetro de massa. Adaptado de [58, 60].	18
Figura 10 – Representação esquemática de uma trapa de íões. Adaptado de [58, 61].	20
Figura 12 - Esquema representativo da sequência dos procedimentos metodológicos utilizados na análise de diversos parâmetros bioquímicos no músculo cardíaco de ratos <i>Wistar</i> diabéticos tipo 1 e controlo.	29

Figura 12 – Efeito da administração de STZ na atividade da enzima citrato sintase avaliada no tecido cardíaco. (* <0,01 vs. CONT)	40
Figura 13 – Efeito da administração de STZ na abundância relativa e na organização supramolecular da cadeia respiratória mitocondrial cardíaca. (A) BN-PAGE representativo da separação dos complexos da fosforilação oxidativa com representação à direita da sobreposição da variação de densidade ótica das bandas de ambos os grupos experimentais. (B) Imagem representativa da marcação histoquímica subjacente à atividade <i>in-gel</i> dos complexos IV e V e (C) avaliação quantitativa da atividade dos complexos IV e V. (** <0,05 vs. CONT; *** <0,001 vs. CONT).....	41
Figura 14 – Efeito da administração de STZ na atividade do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial avaliada no tecido cardíaco.....	42
Figura 15 – Efeito da administração de STZ no teor de proteínas mitocondriais carboniladas e nitradas, avaliadas por <i>slot-blot</i> . (** <0,05 vs. CONT; *** <0,001 vs. CONT)	42
Figura 16 – Separação por TLC das principais classes de lípidos obtidos após fracionamento de extratos lipídicos totais de mitocôndrias de tecido muscular cardíaco de ratos controle (CONT) e de ratos diabéticos (DMT1). (Cer-1-P: ceramida-1-fosfato, CL: cardiolipina, Pa: ácido fosfatídico, PE: glicerofosfatidiletanolamina, PG: glicerofosfatidilglicerol, PS: glicerofosfatidilserina, PI: glicerofosfatidilinositol, PC: glicerofosfatidilcolina, SM: esfingomielina, LPC: lisofosfatidilcolina).	43
Figura 17 – Percentagem relativa das diferentes classes de lípidos mitocondriais, separados por TLC de extratos lipídicos totais de ratos controle e de ratos diabéticos. (Cer-1-P: ceramida-1-fosfato, CL: cardiolipina, Pa: ácido fosfatídico, PE: fosfatidiletanolamina, PG: fosfatidilglicerol, PI: fosfatidilinositol, PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomielina, LPC: lisofosfatidilcolina).....	44
Figura 18 – Espectros ESI-MS modo negativo de extratos de CL separadas por TLC, de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos.	46
Figura 19 – A) Espectros de MS/MS do íon $[M-H]^-$ com m/z 1447 e $[M-2H]^{2-}$ com m/z 723 correspondente à CL (C18:2) ₄ presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas na cardiolipina $[M-H]^-$ com valor de m/z 1447 com formação dos íons produto $[M-H-R_1COOH]^-$, $[PA+56-H]^-$, $[PA+136-H]^-$, $[PA-H-R_2'COOH]^-$ e $[PA-H]^-$	48

Figura 20 – Espectros ESI-MS modo negativo de extratos de PG separadas por TLC, de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos.	49
Figura 21 – A) Espectro de MS/MS do íão $[M-H]^-$ com m/z 747 correspondente à PG C18:1/C16:0 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íão $[M-H]^-$ com valor de m/z 747 com formação dos íões produto $[M-H-R_1COOH]^-$, $[R_1COO]^-$, $[M-H-R_2COOH]^-$ e $[R_2COO]^-$	52
Figura 22 – Espectros ESI-MS modo negativo de extratos de PI separadas por TLC, de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos.	53
Figura 23 – A) Espectro de MS/MS do íão $[M-H]^-$ com m/z 885 correspondente ao PI C18:1/C16:0 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íão $[M-H]^-$ com valor de m/z 885 com formação dos íões produto $[M-H-R_1COOH]^-$, $[R_1COO]^-$, $[M-H-R_2COOH]^-$, $[R_2COO]^-$, $[M-H-162-R_1COOH]^-$ e $[M-H-162-R_2COOH]^-$	55
Figura 24 – Espectros ESI-QqQ MS modo positivo de extratos de PC de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos, separadas por TLC.....	57
Figura 25 – A) Espectro de MS/MS do íão $[M+H]^+$ com m/z 760 correspondente à PC C16:0/C18:1 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íão $[M+H]^+$ com valor de m/z 760, com formação dos íões produto $[M+H-R_1COOH]^+$, $[M+H-R_2COOH]^+$ e do íão m/z 184 correspondente à fosfocolina.....	60
Figura 26 – Espectros ESI-QqQ MS modo positivo do extrato de PE de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos, separadas por TLC.....	62
Figura 27 – A) Espectro de MS/MS do íão $[M+H]^+$ com m/z 746 correspondente à PE C18:0/C18:1 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íão $[M+H]^+$ com valor de m/z 746 com formação do íão produto $[M+H-141]^+$, correspondente à perda da cabeça polar na forma de fosfoetanolamina (m/z 141).	65
Figura 28 – Espectros ESI-QqQ MS modo positivo de extratos de SM de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos, separadas por TLC.....	66
Figura 29 – A) Espectro de MS/MS do íão $[M+H]^+$ com m/z 815 correspondente à SM d18:1/C24:0 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações	

características verificadas do ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 815 com formação dos iões produto $[M+H-R_2CO-H_2O]^+$ e do ião m/z 184 correspondente à fosfocolina.....68

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Precursor ion scanning</i> (Pre) e <i>neutral loss scanning</i> (N-loss) de classes de fosfolípidos no modo positivo e negativo. Adaptado de [68].	25
Tabela 2 – Efeito da DMT1 na glicémia, hemoglobina glicada e peso corporal. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.	39
Tabela 3 - Efeito da diabetes <i>mellitus</i> nos rácios massa de coração/peso corporal, mtDNA/massa de coração e mtProteína/massa de coração. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.....	40
Tabela 4 – Cardiolípidinas identificadas e analisadas por ESI-MS e por ESI-MS/MS no modo negativo de mitocôndrias isoladas de ratos controlo e de ratos diabéticos tipo 1...47	47
Tabela 5 – Glicerofosfatidilgliceróis identificados e analisados por ESI-MS e por ESI-MS/MS no modo negativo de mitocôndrias de ratos controlo e de ratos diabéticos.	51
Tabela 6 – Glicerofosfatidilinositóis identificados e analisados por ESI-MS e por ESI-MS/MS no modo negativo de mitocôndrias de ratos controlo e de ratos diabéticos.	54
Tabela 7 – Glicerofosfatidilcolinas identificadas no modo positivo por varrimento de <i>parent ion</i> de <i>m/z</i> de 184, de mitocôndrias de ratos controlo e diabéticos, com posterior identificação dos ácidos gordos por ESI-MS/MS no modo positivo.	58
Tabela 8 – Glicerofosfatidiletanolaminas identificadas no modo positivo por varrimento de <i>neutral loss</i> de 141, de mitocôndrias de ratos controlo e de ratos diabéticos, com posterior identificação dos ácidos gordos por ESI-MS/MS no modo negativo.	63
Tabela 9 – Esfingomielinas identificadas no modo positivo por varrimento de <i>parent ion</i> de <i>m/z</i> 184, de mitocôndrias de ratos diabéticos e não diabéticos, com posterior identificação dos ácidos gordos por ESI-MS/MS no modo positivo.	67

ABREVIATURAS

9-AA	9-aminoacridina
ADP	Adenosina Difosfato
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
ANT	<i>Adenine nucleotide translocator</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BN-PAGE	<i>Blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Cer-1-P	Ceramida-1-fosfato
CL	Cardiolipina
CoASH	Coenzima A
CONT	Controlo
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DCM	<i>Diabetic Cardiomyopathy</i>
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzóico
DMT1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNPH	<i>2,4-Dinitrophenylhydrazine</i>
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
DTNB	<i>5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence detection</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FAB	<i>Fast atoms bombardment</i>
FADH ₂	<i>Flavine adenine dinucleotide</i>
GLUT	Glucose transporter
HbA1c	<i>Glycated haemoglobin</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-1-etano-sulfónico
i.p.	Intraperitoneal
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LPC	<i>Lysophosphatidylcholine</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	<i>Mass spectrometry tandem</i>
mtDNA	Mitochondrial DNA

NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide (forma oxidada)</i>
N-loss	<i>Neutral loss scan</i>
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
OXPHOS	<i>Oxidative phosphorylation</i>
PA	<i>Phosphatidic acid</i>
P _i	Fosfato inorgânico
PC	<i>Phosphatidylcholine</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
PG	<i>Phosphatidylglycerol</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>
PMF	<i>Peptide mass fingerprint</i>
POC	<i>Protein carbonyl derivatives</i>
Pre	<i>Precursor ion scan</i>
PS	<i>Phosphatidylserine</i>
Q	Quadrupólo
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SM	<i>Sphingomyelin</i>
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Streptozotocina
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid cycle</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TOF	<i>Time of flight</i>

CAPITULO I
INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por uma hiperglicemia crónica como consequência de uma deficiência na produção de insulina ou por uma diminuição da resposta dos tecidos a esta [1-3]. Existem dois tipos de diabetes, a diabetes tipo 1 e a diabetes tipo 2. A diabetes tipo 1 caracteriza-se por se manifestar maioritariamente em indivíduos jovens como consequência, por exemplo, de uma doença autoimune. Está associada a um baixo índice de massa corporal, ao aumento do catabolismo de proteínas e ácidos gordos (como modo de sustentar as necessidades energéticas) com consequente produção de corpos cetónicos e à necessidade de administração intravenosa de insulina para compensar a pouca secreção desta pelas células β pancreáticas. Por sua vez, a diabetes tipo 2 caracteriza-se por uma resistência à insulina por parte dos seus recetores nos tecidos, manifestando-se assim como uma doença crónica em pacientes mais velhos, apresentando risco para o desenvolvimento de hipertensão e obesidade [1, 4]. Assim, a diabetes *mellitus* apresenta alguns riscos para o desenvolvimento de dislipidémia, de obesidade e de doenças cardiovasculares, como a hipertensão. Para além destes fatores de risco, a hiperglicemia crónica por si só já é considerada como um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, ao comprometer a integridade das células endoteliais [2, 4].

Em condições fisiológicas normais o músculo cardíaco pode utilizar vários substratos para a sua ininterrupta contração, nomeadamente, ácidos gordos, hidratos de carbono e aminoácidos. Entre estes, os ácidos gordos e os hidratos de carbono constituem as principais fontes energéticas, sendo possível ao músculo cardíaco obter 70% de ATP através da oxidação de ácidos gordos e aproximadamente 30% de ATP da oxidação da glucose ou do lactato [5, 6]. O *uptake* de glucose é dependente do seu gradiente transmembranar assim como do teor em transportadores de glucose (GLUT), nomeadamente em GLUT1 e GLUT4 [6]. Apesar de terem a mesma função, o GLUT1 localiza-se na membrana plasmática das células do tecido muscular, ou sarcolema, enquanto o GLUT4 está presente em vesículas no interior da célula, estando a sua deslocação para o sarcolema dependente da concentração de insulina. A insulina controla ainda a expressão génica do *GLUT1* e do *GLUT4* [6]. Camps *et al* (1992) verificaram que, em animais com diabetes *mellitus* tipo 1 induzida pela administração de STZ, a redução da expressão do gene *GLUT4* e a consequente diminuição de expressão de GLUT4 comprometia o *uptake* e a oxidação da glucose por parte do tecido cardíaco [7]. Estes resultados evidenciam a importância da insulina na regulação do *uptake* de glucose e consequentemente no tipo de metabolismo cardíaco [6].

Efetivamente, como a entrada de glucose nas células é dependente da insulina e dos ácidos gordos não, nos indivíduos diabéticos verifica-se um aumento do *uptake* de ácidos gordos e da utilização destes pelo tecido cardíaco. Tal situação ocorre uma vez que os níveis plasmáticos de ácidos gordos estão aumentados, como consequência do aumento da lipólise do tecido adiposo e do aumento da síntese de lipoproteínas no fígado, aumentando os níveis circulatórios de ácidos gordos livres e de triglicerídeos [8]. No entanto, quando a quantidade de ácidos gordos excede a capacidade oxidativa do coração, estes são convertidos em triglicerídeos ou ceramida, induzindo lipotoxicidade [9]. A lipotoxicidade e uma taxa elevada de metabolismo de ácidos gordos, que conduz a um aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS), conduzem à disfunção mitocondrial (Figura 1) [6].

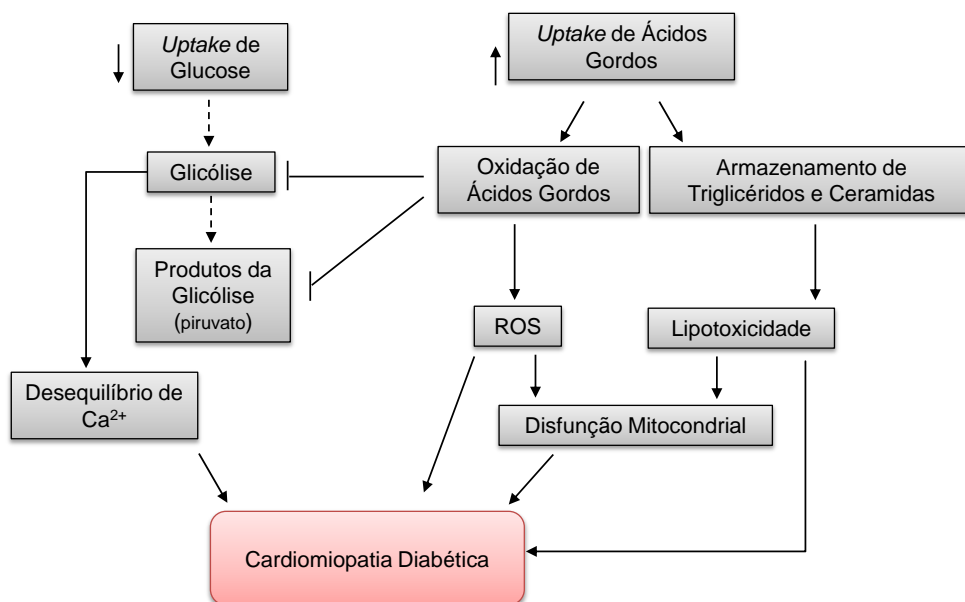


Figura 1 – Alteração do metabolismo das células do músculo cardíaco na diabetes *mellitus* tipo 1 (setas a tracejado indicam as vias metabólicas comprometidas). Adaptado de [6].

Deste modo, devido às alterações metabólicas que ocorrem na diabetes *mellitus*, poderão ocorrer modificações na funcionalidade mitocondrial e consequentemente celulares, que possam contribuir para o desenvolvimento da cardiomiopatia diabética.

A principal causa de mortalidade e morbilidade associada à diabetes *mellitus* é o desenvolvimento de complicações cardiovasculares [10], estimando-se que cerca de 80% dos indivíduos diabéticos acabam por perecer devido a complicações cardiovasculares [4]. Assim sendo o estudo e a compreensão dos processos celulares envolvidos no desenvolvimento das complicações cardiovasculares nas fases iniciais da diabetes *mellitus* poderão ser importantes contribuições para o desenvolvimento de terapêuticas

preventivas e assim permitir o atraso do desenvolvimento das complicações cardiovasculares em indivíduos diabéticos.

1. Cardiomiopatia Diabética

Em 1972, Rubler e seus colaboradores verificaram que, na ausência de alterações da pressão arterial e de doença arterial coronária, a diabetes *mellitus* podia afetar a estrutura e a função cardíaca, conduzindo à cardiomiopatia diabética (DCM) [11].

Os mecanismos envolvidos na diminuição da capacidade de contração do miocárdio subjacente à diabetes *mellitus*, e portanto ao desenvolvimento da DCM, incluem: (i) a diminuição da homeostase do cálcio, (ii) a sobre regulação do sistema renina-angiotensina, (iii) o aumento do *stress* oxidativo, (iv) a alteração do metabolismo por alteração do substrato energético (no caso, da glucose para os ácidos gordos) e (v) a disfunção mitocondrial. A hiperglicemia sustentada também pode levar a um aumento da glicação das proteínas, como o colagénio intersticial, levando também ao aumento da rigidez do miocárdio e ao comprometimento da contratilidade deste [12].

Considerando que o cálcio é o maior regulador intracelular da contratilidade cardíaca é de esperar que uma alteração na sua homeostase induza uma contração anormal do miocárdio com consequente disfunção cardíaca [12]. Num estudo realizado por Cessario *et al* (2006), é descrita a alteração da homeostase do cálcio e de outros iões em cardiomiócitos de indivíduos diabéticos [13], com consequente redução da atividade de ATPases e do *uptake* de cálcio [12, 14]. A ativação do sistema renina-angiotensina na diabetes *mellitus* foi demonstrada como estando associada com o aumento dos danos oxidativos, com a necrose e a apoptose celular dos cardiomiócitos e das células endoteliais do coração, contribuindo assim para o aumento da fibrose intersticial [15]. O aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) no tecido cardíaco de indivíduos diabéticos, não contrabalançado pelas defesas antioxidante, constitui outro fator importante para o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia diabética [12]. O aumento de ROS nas células do miocárdio pode promover o desacoplamento mitocondrial, prejudicando em termos energéticos o miocárdio de pacientes diabéticos. Kuo *et al* (1983) demonstrou uma importante intervenção da disfunção da mitocôndria na patogênese da cardiomiopatia diabética, uma vez que a diabetes *mellitus* causa alterações estruturais e funcionais na mitocôndria [16]. Em situações de diabetes tipo 1 verifica-se uma redução da atividade da ATP sintase e portanto da capacidade oxidativa da mitocôndria [17]. Estudos recentes efetuados em coração de animais com diabetes

tipo 1 e 2, demonstraram também que a sobre-expressão de proteínas antioxidantes como a metalotioneína, a catalase e o superóxido dismutase (SOD) reverteu a condição de cardiomiopatia diabética [18-20]. A ativação inadequada de determinadas vias de sinalização pelos ROS, pode culminar na morte celular, contribuindo para a patogênese da cardiomiopatia diabética. Esta morte celular mediada por ROS pode promover uma remodelação anormal do tecido cardíaco, podendo contribuir para as características morfológicas e funcionais que estão associados à cardiomiopatia diabética [12]. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias que conduzam a uma diminuição da produção de ROS ou que ativem os mecanismos de defesa antioxidante do miocárdio poderá proteger a função do miocárdio indivíduos com diabetes *mellitus*. Por exemplo, numa revisão feita por Sheu e colaboradores (2006) mencionou-se que o gradiente eletroquímico formado na produção de ATP permite a transmissão de cátions lipofílicos para o interior da mitocôndria que boqueiam os danos oxidativos provocados pelos ROS, protegendo a função mitocondrial e prevenindo a morte celular [21, 22]. Deste modo, os antioxidantes dirigidos para as mitocôndrias podem proporcionar alguma proteção contra as agressões oxidativas, permitindo o desenvolvimento de futuros tratamentos preventivos, baseados na ação de moléculas com ação antioxidante, para as complicações resultantes da diabetes *mellitus*. Dada a sua importância na homeostasia celular e sendo um dos locais na célula onde ocorre maior produção de ROS, perturbações na dinâmica mitocondrial poderão ter consequências na sua funcionalidade e consequentemente no metabolismo celular contribuindo assim para a patogênese de muitas doenças crônicas, como a cardiomiopatia diabética [23].

2. Mitocôndria: Função e Composição Molecular

As mitocôndrias são organelos intracelulares complexos de origem procariótica essenciais para numerosas funções metabólicas na célula: são responsáveis pela produção de energia sob a forma de ATP através do processo de fosforilação oxidativa, estão envolvidas na homeostase do cálcio e do ferro e no metabolismo de aminoácidos, ácidos gordos e hormonas esteróides, e ainda intervêm na regulação da apoptose celular [23].

Estruturalmente, as mitocôndrias exibem uma estrutura membranar dupla e possuem um genoma circular com sistemas de transcrição, de transdução, pelo que expressam proteínas específicas pertencentes à fosforilação oxidativa. A membrana exterior é constituída por estruturas proteicas, sendo permeável a pequenas moléculas. Por sua vez, a membrana interna contém enzimas e outras proteínas que intervêm em

diversas vias metabólicas envolvidas na produção de ATP (Figura 2). Na membrana mitocondrial interna, estão presentes os complexos proteicos da cadeia transportadora de elétrons e a ATP sintase (complexo V) (Figura 5). A presença e a correta atividade destes complexos proteicos, permitem à mitocôndria exercer a sua principal função, ou seja, sintetizar ATP [24, 25]. Na matriz e no espaço intermembranar encontram-se localizadas muitas das proteínas, ribossomas e enzimas essenciais para as diferentes vias metabólicas, como é o caso do ciclo do ácido tricarboxílico, TCA (ou ácido cítrico) na matriz mitocondrial [26].

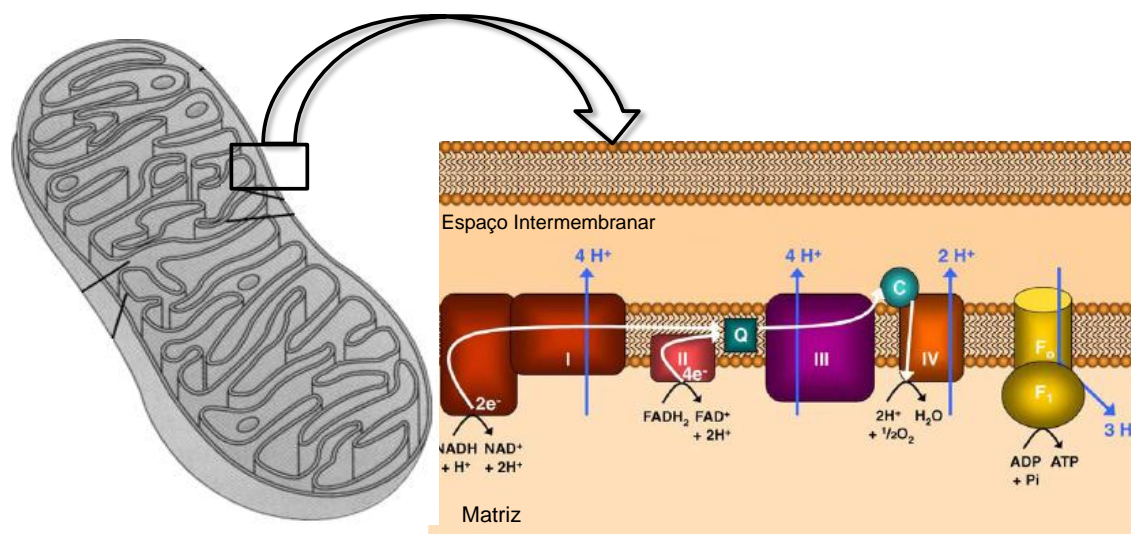


Figura 2 - Ilustração esquemática da mitocôndria, dando ênfase à presença da membrana mitocondrial interna, à membrana mitocondrial externa e aos complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial. Adaptado de [25, 26].

Para além de proteínas, as membranas mitocondriais também possuem fosfolípidos que contribuem para a correta função das proteínas deste organelo. Por sua vez, estas mesmas proteínas regulam a síntese dos fosfolípidos, pelo que uma alteração na constituição lipídica das membranas poderá contribuir para uma alteração funcional das proteínas e vice-versa. A consequente disfunção mitocondrial poderá comprometer a função da célula [27].

Na sua constituição lipídica, a mitocôndria possui a maioria dos fosfolípidos encontrados nas membranas celulares, nomeadamente fosfatidilcolinas (PC), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilserinas (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), assim como fosfatidilglicerol (PG) e a cardiolipina (CL) (Figura 3). A cardiolipina e o fosfatidilglicerol têm uma localização predominante, se não mesmo exclusiva, nas membranas mitocondriais.

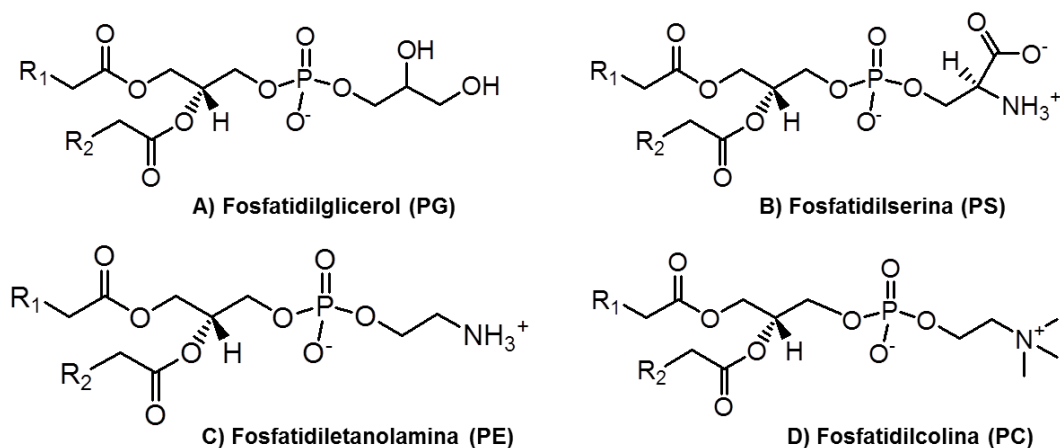


Figura 3 – Exemplos de estruturas químicas de alguns fosfolípidos, como por exemplo, fosfatidilglicerol (A), fosfatidilserina (B), fosfatidiletanolamina (C) e fosfatidilcolina (D). Adaptado de [28].

De todos os fosfolípidos referidos apenas as fosfatidiletanolaminas, os fosfatidilgliceróis e as cardiolipinas são sintetizados na mitocôndria enquanto os restantes fosfolípidos são incorporados por este organelo. Assim, a biogénese das membranas mitocondriais envolve importação e síntese coordenada de proteínas e fosfolípidos. A membrana interna possui uma composição única de proteínas e fosfolípidos cuja interdependência constitui um fator crucial para a correta funcionalidade do organelo [27]. São vários os estudos realizados onde se especula sobre a percentagem relativa dos fosfolípidos nas membranas mitocondriais. Num estudo realizado por Ardail e seus colaboradores (1990) foi possível verificar que tanto na membrana interna como na membrana externa das mitocôndrias de células hepáticas de rato os fosfolípidos que se encontram em maior quantidade relativa são as PC's, as PE's e a CL, sendo a quantidade relativa CL mais acentuada na membrana mitocondrial interna [29]. Quantidades relativas semelhantes foram observadas em mitocôndrias de tecido cardíaco de rato e de vaca [30, 31]. Entre estas classes, as cardiolipinas são determinantes para a estrutura e função das proteínas de membrana e alterações no teor relativo, composição de cadeias acil e suscetibilidade à peroxidação lipídica têm sido associadas à disfunção mitocondrial.

2.1. Importância da Cardiolipina na Patofisiologia da Diabetes *Mellitus* Tipo 1

A importância da cardiolipina na membrana mitocondrial pode dever-se à sua capacidade em interagir com proteínas e em manter a fluidez e estabilidade osmótica da membrana interna mitocondrial [2]. Este lípido é necessário para o correto *folding* e

atividades dos vários complexos proteicos da cadeia respiratória mitocondrial, para a manutenção da estabilidade osmótica e tem sido proposta a sua participação direta na condução de prótons através do citocromo *bc1* [2]. Para além da sua importância na bioenergética da mitocôndria, a cardiolipina prende electrostáticamente o citocromo *c* na membrana interna mitocondrial [32] e pode, portanto, desempenhar um papel importante na libertação deste com consequente ativação da apoptose [33]. A cardiolipina desempenha também uma importante função na biogénese da mitocôndria [2] e na organização dos supercomplexos enzimáticos da cadeia respiratória [34]. Dada a importância da cardiolipina na função mitocondrial é de se esperar que qualquer alteração no seu conteúdo ou composição possa comprometer a mesma.

Evidências experimentais sugerem que a ocorrência de pelo menos três tipos de alterações no perfil da cardiolipina na mitocôndria pode conduzir ao desenvolvimento de patologias: (i) a perda de cardiolipinas, foi já observada no processo de envelhecimento e na insuficiência cardíaca (ii) a peroxidação de cardiolipinas foi descrita em doenças neurodegenerativas como o Parkinson ou o Alzheimer e (iii) a alteração da composição da cadeia acil das cardiolipinas foi observada no Síndrome de Barth [2].

A diminuição do conteúdo mitocondrial de cardiolipinas é a alteração patológica mais descrita do perfil de cardiolipinas. Uma perda seletiva do teor deste fosfolípido na mitocôndria pode dever-se ao aumento da sua degradação ou à diminuição da sua síntese resultante da disfunção de enzimas envolvidas ou da diminuição da biodisponibilidade dos seus precursores, como o glicerofosfatidilglicerol [2].

Entre os vários fosfolípidos presentes nas mitocôndrias, a cardiolipina (CL) destaca-se pois possui uma estrutura dimérica, ou seja, este fosfolípido é constituído por dois fosfatidilgliceróis ligados entre si pela molécula de glicerol (Figura 4), resultando na presença de quatro grupos acil, três moléculas de glicerol e dois grupos fosfato presentes em cada molécula de CL [2, 35, 36]. A variedade de ácidos gordos e as combinações possíveis entre estes permite que o padrão molecular das espécies de cardiolipina possa variar entre tecidos e até mesmo entre organismos [35]. Krebs e seus colaboradores (1979) verificaram que a cardiolipina constitui 25% do total do teor fosfolipídico da membrana interna mitocondrial [30] enquanto na membrana externa a sua percentagem é apenas de aproximadamente 4% [36].

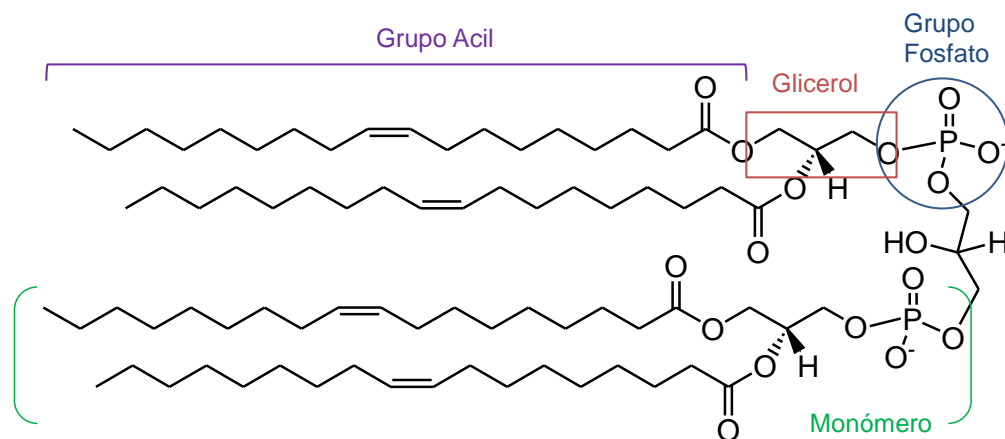


Figura 4 – Estrutura da cardiolipina com os diferentes grupos que a constituem. Adaptado de [35].

A cardiolipina é suscetível à peroxidação devido à abundância de ligações duplas nas suas cadeias de ácidos gordos. Esta suscetibilidade também pode ocorrer porque a cardiolipina se encontra associada às proteínas da cadeia respiratória, onde nas mitocôndrias ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (ROS), favorecendo deste modo o processo de peroxidação da CL. Alguns estudos demonstram que a ação de ROS na cardiolipina pode conduzir a uma grande diminuição do seu conteúdo mitocondrial para além de a tornar incapaz de suportar a atividade das enzimas da cadeia respiratória [2]. Musatov (2006) verificou que a atividade da citocromo c oxidase diminuía quando este era exposto à cardiolipina peroxidada [37].

Relativamente à cardiomiopatia diabética, apesar dos resultados até então descritos não serem conclusivos, tem sido proposto que alterações nas estruturas ou no teor de cardiolipinas presentes nas mitocôndrias podem estar associadas aos processos que levam ao desenvolvimento desta complicação cardíaca [36]. Nomeadamente, Taylor e seus colaboradores (2002) verificaram que, 34 dias após a administração de STZ, o conteúdo mitocondrial em cardiolipina no coração de ratos diabéticos não era afetado pela diabetes [38]. Posteriormente, Han e seus colaboradores (2007), utilizando o mesmo modelo animal para a diabetes tipo 1 mas por um período de 4 meses, observaram uma diminuição dos níveis de cardiolipina [39].

Apesar da reconhecida importância da CL na estabilidade dos complexos da fosforilação oxidativa, as alterações específicas neste fosfolípido subjacentes à patogênese da cardiomiopatia diabética permanecem ainda por clarificar [36], bem como de que forma a cardiomiopatia diabética condiciona a interação deste fosfolípido com os complexos da fosforilação oxidativa.

2.2. Efeito da Diabetes *Mellitus* Tipo 1 na Fosforilação Oxidativa

Em condições celulares normais as moléculas NADH e FADH₂ resultantes da oxidação de moléculas orgânicas, como a glucose e os ácidos gordos, são oxidadas na cadeia transportadora de eletrões. Neste processo os eletrões da forma oxidada do dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH) são transferidos para o complexo I (NADH desidrogenase) e posteriormente para a coenzima Q10, ou ubiquinona. Os eletrões provenientes do succinato do ciclo do ácido cítrico seguem outro percurso, sendo transferidos primeiro para o complexo II (succinato desidrogenase) e depois para a ubiquinona. A partir da ubiquinona, os eletrões seguem para o complexo III (citocromo *bc*₁), para o citocromo *c*, deste para o complexo IV (citocromo *c* oxidase) e finalmente para O₂ originando H₂O. Com esta sucessiva passagem dos eletrões através dos vários complexos da cadeia transportadora de eletrões forma-se um gradiente eletroquímico de prótons entre o interior e o exterior da membrana mitocondrial interna (Figura 5), permitindo a formação de ATP através da condensação de ADP com fosfato inorgânico (P_i). Posteriormente o ATP formado na matriz mitocondrial é então exportado para o citosol pela ANT (*adenine nucleotide translocator*), com permuta de ADP exterior [24, 25, 40].

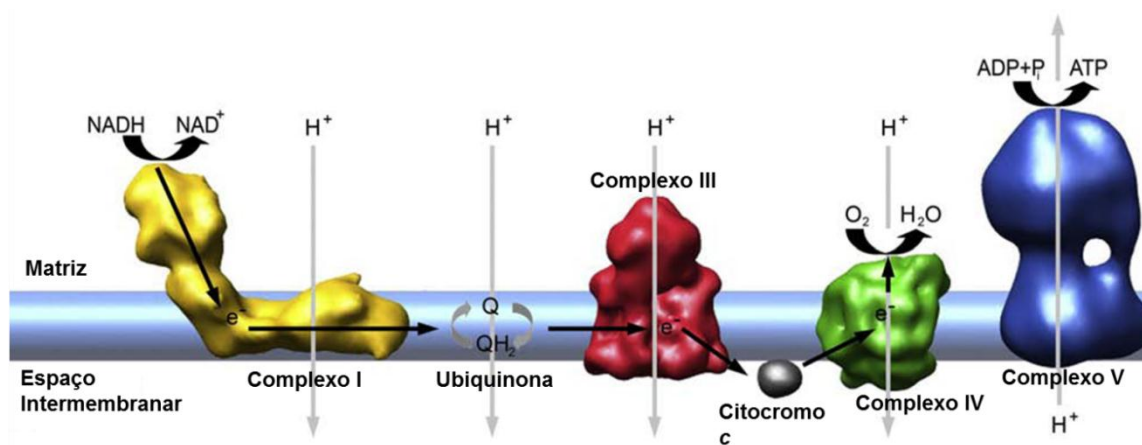


Figura 5 – Cadeia respiratória mitocondrial. Os complexos proteicos transmembranares da cadeia transportadora de eletrões criam um gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial interna necessário para a formação de ATP pela ATP sintase. Adaptado de [24].

A função mitocondrial tem sido alvo de vários estudos, nomeadamente no âmbito da patogênese da diabetes *mellitus*. Hall *et al* (1960) verificaram que as mitocôndrias permanecem com um tamanho, número e capacidade fosforilativa normais quando isoladas de fígado de ratos com formas moderadas de diabetes (níveis sanguíneos de glucose entre 180 a 220 mg/dL). No entanto, em situações de extrema glicosúria e níveis

sanguíneos de glucose superiores a 300 mg/dL tal cenário já não se verifica, sendo necessárias pequenas quantidades de insulina para manter o correto funcionamento mitocondrial [41]. O mesmo foi observado por Gross e colaboradores (1971) [42] e estudos mais recentes apresentam uma maior discrepância de resultados. Por exemplo, Ferko *et al* (2006) verificaram um comprometimento da fosforilação oxidativa de mitocôndrias isoladas do coração de ratos com diabetes 8 dias após a administração de STZ [43]. No entanto, Moreira *et al* (2006) não observaram alterações significativas da respiração mitocondrial em mitocôndrias isoladas de rim e de coração de animais após 12 semanas da administração de STZ [44]. Esta variabilidade de resultados pode dever-se ao grau e severidade da diabetes, e também ao modelo animal utilizado para o estudo da diabetes.

Associada a esta disfunção mitocondrial observada no tecido cardíaco de indivíduos diabéticos tem sido sugerido um aumento do teor de ROS [4]. Mesmo em situações fisiológicas normais, ocorre a formação de ROS ao nível da OXPHOS. Efetivamente, cerca de 0,4 - 4 % do oxigénio consumido é utilizado na produção de ROS, posteriormente neutralizados pelos mecanismos antioxidantes celulares [4].

2.3. Formação de ROS na Mitocôndria

A cadeia respiratória mitocondrial tem como principal função a produção de energia sobre a forma de ATP. No entanto, durante este processo, pode ocorrer a formação não enzimática de espécies reativas de oxigénio [4]. Efetivamente a fosforilação oxidativa é a maior fonte endógena de espécies reativas de oxigénio ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e OH^{\cdot}), que são produtos secundários tóxicos às biomoléculas presentes na mitocôndria e na célula em geral. Em condições fisiológicas normais, o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é convertido em H_2O_2 pela ação da superóxido dismutase (SOD) e posteriormente em H_2O na presença da glutathione peroxidase mitocondrial. Caso ocorra difusão do H_2O_2 para o citosol, a enzima catalase remove-lhe a sua toxicidade ao converte-lo em H_2O e O_2 . No entanto, o H_2O_2 na presença de metais de transição redutores, como ião ferroso Fe^{2+} , pode ser convertido no radical hidroxilo OH^{\cdot} altamente reativo (Reação de Fenton) [4, 25, 40].

Em algumas doenças, como a DCM, a exposição excessiva a ROS pode resultar em danos na mitocôndria, nas proteínas, nos lípidos e nos ácidos nucleicos da célula. Os danos mitocondriais podem traduzir-se pela inativação dos centros ferro-enxofre dos complexos I, II e III e de algumas proteínas do ciclo do ácido cítrico, importantes para a

produção de energia [40]. Para além dos danos nas biomoléculas mitocondriais (e celulares), o aumento da produção de ROS também pode conduzir à ativação da apoptose celular. Na membrana mitocondrial interna existem fatores promotores da morte celular, nomeadamente o citocromo c e uma flavoproteína designada por fator indutor da apoptose (*apoptosis-inducing fator*, AIF). A abertura de poros de permeabilidade mitocondrial na membrana interna pode iniciar-se pelo excessivo *uptake* mitocondrial de Ca^{2+} , pelo aumento da exposição a ROS ou por um declínio da capacidade energética (Figura 6). Consequentemente, verifica-se a perda do gradiente eletroquímico e a consequente libertação dos fatores promotores da apoptose, ativando-se a apoptose celular [40].

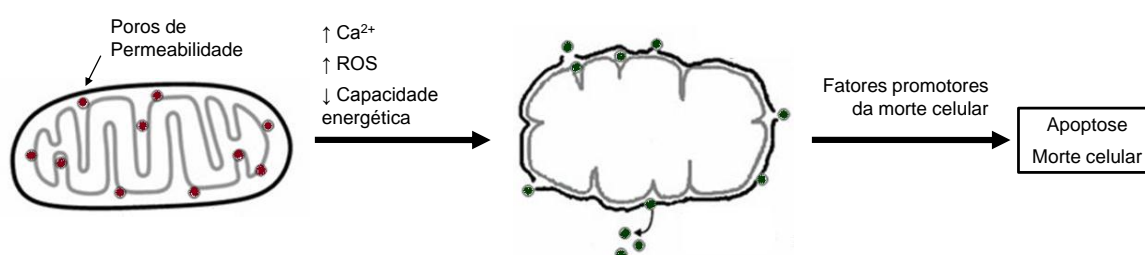


Figura 6 – Representação dos possíveis fatores indutores da apoptose. Adaptado de [40].

Em situações patológicas em que ocorre um aumento da produção de ROS verifica-se, geralmente, um incremento de modificações pós-traducionais nas proteínas mitocondriais com consequentes repercussões funcionais. Tem sido sugerido na literatura que modificações oxidativas de enzimas e proteínas estruturais, nomeadamente com aumento da carbonilação e nitração, desempenham um papel bastante significativo na etiologia e progressão de várias doenças. Por exemplo, o teor de proteínas carboniladas tem sido sugerido como biomarcador de dano oxidativo nas proteínas, sendo várias as doenças humanas associadas à carbonilação de proteínas, das quais se inclui a diabetes *mellitus*. Para além da formação de proteínas carboniladas também tem sido defendido que outras modificações proteicas, como por exemplo a conversão de resíduos de tirosina em 3-nitrotirosina, podem ser utilizadas como marcadores do *stress* oxidativo [45].

Assim, a avaliação destas modificações pós-traducionais nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial poderá ajudar a elucidar os mecanismos subjacentes à patogênese da cardiomiopatia diabética.

2.3.1. Nitração: Produção e Efeito do Óxido Nítrico na Mitocôndria

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula com tempo de semivida curto mas com uma grande capacidade de se difundir em meios aquosos e através de membranas biológicas. Esta molécula tem a característica de ser mais solúvel num solvente hidrofóbico do que em água conferindo-lhe assim a capacidade de se concentrar nas membranas celulares, incluindo as membranas mitocondriais [46]. No sistema cardiovascular e no coração em particular, o NO desempenha uma importante função na regulação da contração cardíaca, no consumo de oxigénio, na utilização de substratos, na apoptose e na hipertrofia. A sua produção pode ocorrer enzimaticamente, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase*, NOS), ou não enzimaticamente, por exemplo através da conversão não enzimática de nitrato ou de nitrito [46].

Na mitocôndria a ação de NO é particularmente relevante devido à presença da enzima NOS ativa na membrana interna [46]. O NO produzido pelas enzimas NOS mitocondriais reage com as metaloproteínas da mitocôndria, como é o caso do complexo IV ou citocromo *c* oxidase, sendo responsável pela alteração da sua função. Para além da suscetibilidade mitocondrial ao NO, a mitocôndria também é suscetível ao peroxinitrito (ONOO⁻), resultante da reação entre o anião superóxido intracelular e o NO. O modo como o peroxinitrito afeta a estrutura dos complexos proteicos mitocondriais passa pela sua rápida reação com aminoácidos aromáticos presentes na estrutura destes complexos, como é o caso da tirosina. Da reação entre o peroxinitrito e a tirosina resulta a molécula 3-nitrotirosina, que é geralmente considerada como um marcador da ação de espécies reativas de azoto (RNS) e portanto do *stress* oxidativo provocado por estas espécies [38, 47]. Assim, o peroxinitrito vai portanto afetar a estrutura dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial e dos canais localizados na membrana [46]. A ação tóxica da 3-nitrotirosina no sistema cardiovascular tem sido destacada em vários estudos. Stadler *et al* (2003) verificaram que, em corações de ratos diabéticos tratados com STZ, há um aumento da apoptose das células endoteliais, dos miócitos e dos fibroblastos, demonstrando que níveis elevados de óxido nítrico e de peroxinitrito poderão desempenhar uma função decisiva no desenvolvimento de complicações no sistema vascular de indivíduos diabéticos [48].

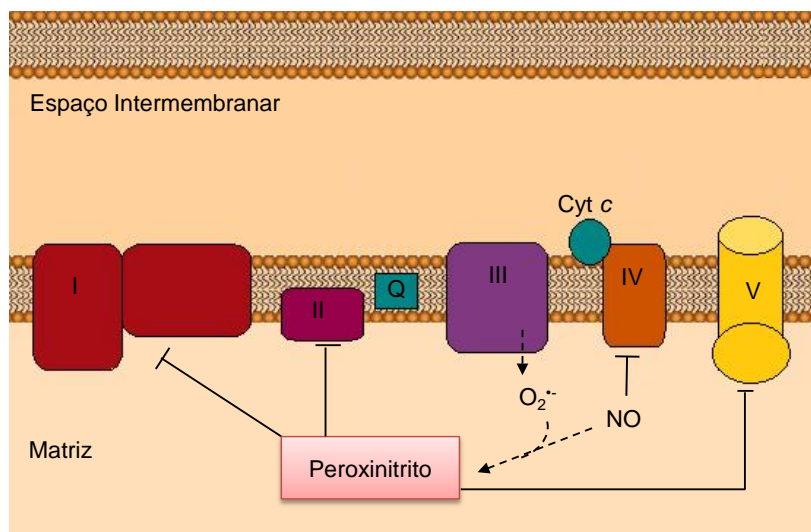


Figura 7 – Possíveis reações do NO na membrana mitocondrial interna (I: complexo I, II: complexo II, III: complexo III, IV: complexo IV, V: complexo V, Q: ubiquinona, Cyt c: citocromo c, NO: óxido nítrico, $O_2^{\bullet -}$: ânion superóxido). Adaptado de [46, 49].

O NO interage com vários complexos da fosforilação oxidativa (Figura 7) afetando a produção de ATP e de espécies reativas de oxigênio. A ligação do NO ao complexo IV, complexo terminal da cadeia transportadora de elétrons, inibe todo o processo de respiração celular. O NO também afeta outros complexos da cadeia respiratória, nomeadamente o complexo I, II e III [50]. Apesar da exposição prolongada do complexo I ao NO resultar na sua inibição, o mecanismo de inibição ainda não é totalmente conhecido [51]. O NO também inibe o complexo II em cerca de 95 %, devido essencialmente à destruição dos *clusters* de ferro-enzofre [52]. O processo de transferência de elétrons entre os complexos I e III também é afetado pelo NO uma vez que este pode oxidar o transportador ubiquinol (QH_2), resultando em ubiquinona (Q^{\bullet}) e o ânion nitroxílo (NO^- , produto da redução de NO) [51].

2.3.2. Carbonilações: Produção e Efeitos

Considerada como outra modificação pós-traducional de proteínas que decorre na sua perda de função, a carbonilação tem sido determinada para avaliar o *stress* oxidativo. Tal deve-se ao facto de os produtos resultantes da oxidação de proteínas (aldeídos e cetonas), relativamente aos produtos de peroxidação lipídica, serem mais estáveis e apresentarem uma maior permanência na circulação sanguínea, podendo atuar como intermediário de alguns processos sinalizadores de reações redox, resultando no desenvolvimento de várias doenças [45, 53, 54].

A oxidação proteica promovida pelas espécies reativas de oxigénio, resulta em derivados de proteínas carboniladas (*protein carbonyl derivatives*, POC), que se traduzem pela inserção de grupos carbonilo, como cetonas e aldeídos, nas cadeias secundárias dos aminoácidos. A oxidação de proteínas pode dar-se pela ação direta dos ROS numa reação designada por reação “primária de carbonilação de proteínas”, ou pela ação de produtos resultantes da oxidação de outras biomoléculas (como os lípidos) numa reação designada por reação “secundária de carbonilação de proteínas” [53, 55, 56]. Na reação “primária de carbonilação de proteínas” o radical hidroxilo (HO^\bullet), resultante da reação do peróxido de hidrogénio com iões metálicos, como o Fe^{2+} , é responsável pela oxidação das cadeias secundárias dos aminoácidos ou causar a quebra da proteína, conduzindo em ambas as situações à formação de grupos carbonilo [57]. Os aminoácidos presentes nas estruturas proteicas que são mais suscetíveis ao processo de carbonilação são a arginina, a lisina e a prolina [45, 56]. Por sua vez, a reação “secundária de carbonilação de proteínas” ocorre pela ação de grupos carbonilos que resultaram da ação direta de ROS nos lípidos e nas proteínas [45, 57].

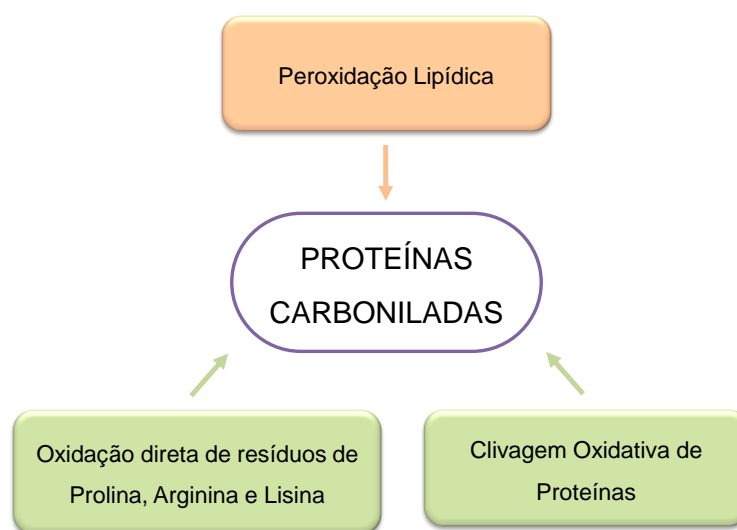


Figura 8 – Possíveis origens dos derivados carbonilados de proteínas. Nas caixas verdes encontram-se descritos os processos das reações “primárias de carbonilação de proteínas” enquanto nas caixas laranja encontram-se descritos os processos das reações “secundárias de carbonilação de proteínas”. Adaptado de [45].

A ação de ROS nos ácidos gordos polinsaturados existentes nos lípidos das membranas inicia reações em cadeia que conduzem à formação de uma variedade de espécies de carbonilo, com 3 a 9 carbonos de comprimento. Desta peroxidação lipídica, os produtos formados mais reativos são os aldeídos α,β -insaturados, os di-aldeídos e os ceto-aldeídos [53]. Por sua vez, estas espécies reativas vão introduzir grupos carbonilo

nas proteínas ao reagir com o grupo amina da lisina, com a fração imidazole da histidina ou com o grupo sulfidril (-SH) da cisteína presentes na cadeia secundária dos aminoácidos existentes na proteína, podendo conduzir à perda da função proteica [45]. Por sua vez, a ação direta de ROS nas proteínas pode levar à sua clivagem resultando na formação de péptidos com um derivado α -ceto no N-terminal [57]. Os péptidos formados podem reagir com os resíduos de cisteína, histidina ou lisina presentes nas estruturas das proteínas mitocondriais levando à formação de derivados de proteínas carboniladas [45].

Como resultado da oxidação proteica e da consequente formação de derivados de proteínas carboniladas, ocorrem modificações estruturais irreversíveis, que resultam na perda da sua função proteica e no aumento da suscetibilidade à proteólise [55, 56]. Assim, o aumento da produção de ROS na mitocôndria e consequentemente do teor de proteínas carboniladas, a perda da funcionalidade mitocondrial que ocorre poderá estar associado à perda da estrutura e função das proteínas mitocondriais conduzindo assim ao desenvolvimento de doenças, como a cardiomiopatia diabética. Por sua vez, o desenvolvimento de agentes capazes de controlar a carbonilação de proteínas celulares poderá constituir estratégia terapêutica contra várias doenças.

De modo a ser possível obter-se uma melhor compreensão dos mecanismos que conduzem à disfunção mitocondrial e a doenças associadas, tem-se utilizado a espectrometria de massa para a identificação de biomoléculas que possam estar envolvidas, devido à sua elevada sensibilidade, facilidade de manuseamento e elevada reprodutibilidade.

3. Aplicação da Espectrometria de Massa no Estudo da Cardiomiopatia Diabética

A espectrometria de massa é uma técnica analítica bastante usada para a identificação de compostos, fornecendo importantes informações sobre a estrutura do composto a analisar. Esta técnica tem como princípio de funcionamento a formação de iões em fase gasosa (carregados positivamente ou negativamente) que são separados e detetados com base na sua razão massa/carga (m/z) [58, 59].

De um modo geral, um espectrómetro de massa é constituído por três componentes (Figura 9): uma fonte de ionização onde se formam as espécies ionizadas do composto, um analisador onde os iões formados são separados com base no valor de m/z e um detetor onde os iões são recolhidos e caracterizados através da produção de

um sinal que traduz a intensidade de cada ião separado de acordo com o seu valor de m/z [60].

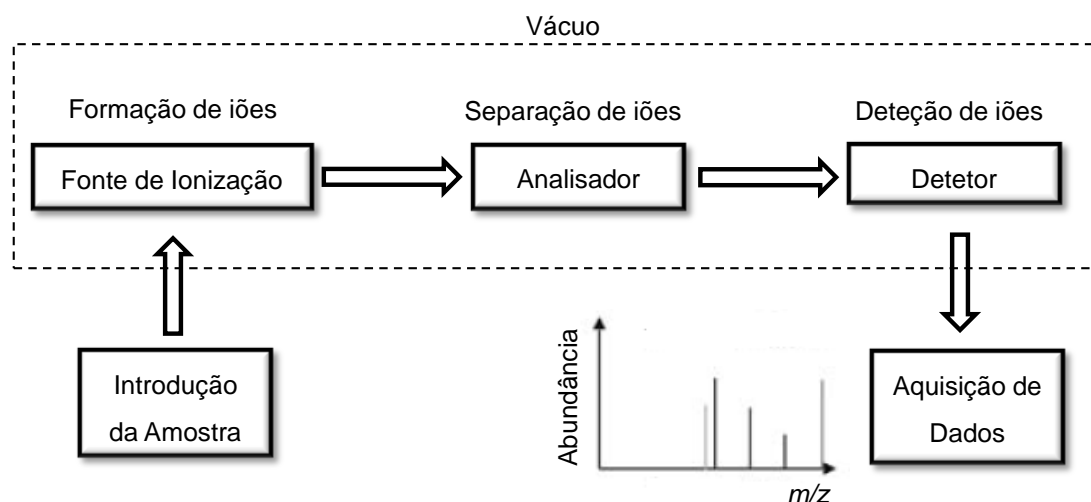


Figura 9 – Esquema representativo das várias componentes de um espectrómetro de massa. Adaptado de [58, 60].

Desde que Thomson, em 1913, inventou o primeiro espectrómetro de massa, esta técnica tem sofrido inúmeras modificações, permitindo o seu uso nas mais variadas áreas científicas. Nos itens que se seguem irá ser abordado os vários componentes de um espectrómetro de massa, dando ênfase ao seu uso nos estudos bioquímicos, nomeadamente nos estudos de lípidos e de proteínas.

3.1. Fontes de Ionização

Atualmente, em espectrometria de massa são várias as fontes de ionização existentes e utilizadas. Os primeiros métodos de ionização de compostos (voláteis e não voláteis) foram a ionização por impacto eletrónico e ionização química. Estas duas fontes de ionização demonstraram-se ser adequadas para moléculas com um peso molecular baixo. No entanto para moléculas com um peso molecular elevado, como as biomoléculas, estas técnicas de ionização demonstraram-se pouco aplicáveis [61]. Posteriormente, com a introdução nos espectrómetros de massa da técnica de ionização FAB (*fast atoms bombardment*) foi possível ionizar e detetar com alguma sensibilidade as moléculas com elevada massa molecular. No entanto, com o desenvolvimento do MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) e do ESI (*electrospray ionization*), duas técnicas de ionização que permitiam a ionização de biomoléculas com uma massa

molecular elevada, os métodos de ionização mais usados hoje em dia tanto para o estudo de lípidos como para o estudo de proteínas são o MALDI e o ESI [61]).

O MALDI é um método de ionização que permite uma ionização de moléculas com massas superiores a 500.000 Da, tornando-o o método de eleição para a análise de biomoléculas de elevada massa molecular como as proteínas, o DNA e glicoconjugados [59]. Neste método, a amostra é embebida numa matriz que após cristalizada é analisada no espectrómetro de massa. A ionização da amostra dá-se através da irradiação da amostra por pulsos de laser que causa a dessorção e a ionização da matriz e do analíto, quer por protonação (íões carregados positivamente) ou por desprotonação (íões carregados negativamente) [60, 61]. Por sua vez, em ESI a amostra é normalmente dissolvida num solvente polar e é injetado por uma seringa no espectrómetro de massa. À medida que a amostra é injetada na fonte de ionização, um potencial elétrico é aplicado e formam-se gotas altamente carregadas. Estas gotas carregadas são vaporizadas pela utilização de um gás neutro (nomeadamente azoto), resultando na quebra e consecutiva redução do tamanho das gotas até que estas correspondam a um ião [59]. Assim como no MALDI, no ESI também é possível obter-se a ionização da amostra no modo positivo e no modo negativo.

Independentemente do tipo de ionização utilizado, em todos os espectrómetros de massa os iões formados são direcionados pela ação de campos elétricos para os analisadores onde são separados de acordo com a respetiva razão m/z .

3.2. Tipos de Analisadores

Na utilização da espectrometria de massa para os estudos de lípidos e de proteínas os analisadores mais frequentemente usados são o TOF (*time of flight*), o quadrupólo (Q) e a trapa de iões (*ions trap*).

A utilização do TOF baseia-se no voo livre dos iões formados ao longo de um tubo até atingirem o detetor. Assumindo-se que todos os iões que chegam ao detetor têm a mesma energia cinética, então os iões com diferentes massas irão ter diferentes velocidades atingindo o detetor em diferentes tempos. Deste modo, os iões com menores valores de m/z atingem o detetor primeiro que os iões com valores de m/z maiores, permitindo a deteção de todos os iões formados [58, 59]. No entanto, como algumas variações nas energias cinéticas entre os iões são inevitáveis, o TOF linear apresenta uma baixa resolução e precisão na massa. Esta limitação foi ultrapassada pela inserção de um reflector, que ao desviar o percurso dos iões permite aos iões com a mesma

massa atingirem o detetor ao mesmo tempo, melhorando assim a resolução do analisador [59, 61].

O quadrupólo (Q) apresenta a vantagem de ter uma elevada sensibilidade, um baixo custo e uma facilidade de manuseamento. No entanto, este analisador apresenta uma resolução e um intervalo de detecção de massas baixos [58]. O quadrupólo consiste em 4 barras elétricas paralelas, através das quais os iões alcançam uma trajetória estável até ao detetor. Este analisador opera através da aplicação de uma voltagem (DC) num par de barras e de uma voltagem oscilatória no segundo par de barras. As voltagens aplicadas com diferentes polaridades permitem a formação de campos elétricos alternativos que ajudam a estabilizar a passagem dos iões com um determinado valor de m/z , permitindo apenas a estes iões alcançar o detetor. Assim, variando os sinais elétricos do quadrupólo é possível variar o intervalo de iões transmitidos ao detetor e assim diferenciar os iões e obter um espectro de massa [59, 61].

A trapa de iões (*ion trap*) tem três elétrodos: um elétrodo em forma de anel e dois elétrodos *endcap* (Figura 10), criando um campo elétrico tridimensional onde os iões ficam “presos” por períodos de tempo relativamente longos.

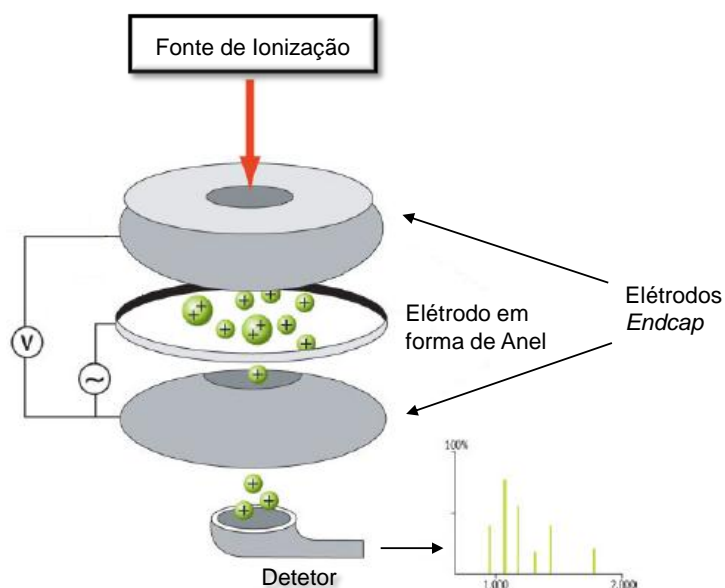


Figura 10 – Representação esquemática de uma trapa de iões. Adaptado de [58, 61].

Deste modo, à medida que a voltagem dos elétrodos é alterada, as trajetórias dos iões tornam-se instáveis permitindo a transferência sequencial dos iões até ao detetor [58, 61].

3.3. Detetores

Num espectrômetro de massa, o detetor tem como função detetar e converter em sinal os iões formados na fonte de ionização e separados no analisador, sendo capazes de gerar uma corrente elétrica proporcional à abundância dos iões provenientes do analisador. Existem vários tipos de detetores, podendo ser divididos em duas categorias. Alguns detetores baseiam-se na medição direta da corrente produzida pelos iões quando atingem uma superfície e são neutralizados, como é o caso do detetor Faraday *cup*. Por sua vez outros detetores, como o multiplicador de eletrões e o detetor de iões eletro-ótico, baseiam-se na transferência de energia cinética dos iões que colidem numa superfície, gerando eletrões secundários que posteriormente são amplificados para dar origem a uma corrente elétrica [62].

Após a deteção dos iões separados de acordo com a respetiva razão massa/carga, os dados obtidos são adquiridos por um computador acoplado ao espectrômetro de massa que os processa e converte em espectros. Estes espectros têm representado no eixo das abcissas os valores de m/z dos iões separados e no eixo das ordenadas a abundância de cada um desses iões separados e detetados no espectrômetro de massa [62].

3.4. Espectrometria de Massa Tandem (MS/MS)

De um modo geral a espectrometria de massa tandem pode ser realizada com dois tipos diferentes de instrumentação: com 2 ou mais analisadores dispostos em série (MS tandem espacial), como é o caso dos sistemas triplo quadrupólo (QqQ) e quadrupólo-TOF (Q-TOF), ou com apenas um analisador capaz de prender os iões (MS tandem temporal), como é o caso da trapa de iões [61].

Na realização de MS tandem espacial recorre-se à ligação de 2 ou mais analisadores em série, de modo a ser possível selecionar um ião e examinar a sua fragmentação. Ou seja, a seleção do ião a fragmentar é feita no primeiro analisador, na célula de colisões ocorre a fragmentação do ião previamente selecionado. e no segundo analisador separam-se os iões fragmento de acordo com os seus valores de m/z e direciona-os para o detetor de modo a obter-se um espectro característico da fragmentação do ião previamente selecionado [59]. No entanto, os espectrômetros de massa que possuem sistema de trapa de iões são capazes de realizar todas as três etapas de MS/MS com apenas uma trapa de iões [58].

Para a determinação da estrutura de uma molécula, é possível na espectrometria de massa tandem realizar três tipos diferentes de varrimento: (i) varrimento do ião produto, (ii) varrimento de iões percursores e, (iii) varrimento da perda neutra [62].

O varrimento do ião produto consiste na seleção de um ião precursor com uma razão massa/carga selecionada e na posterior determinação de todos os iões produto resultantes da dissociação do ião precursor [62, 63].

Com o varrimento do ião precursor (ou *parent ion scan*) é possível procurar compostos que produzem um fragmento comum. Neste tipo de varrimento o primeiro analisador transmite à célula de colisões todos os iões provenientes da fonte de ionização para posterior dissociação. Por sua vez, no segundo analisador é selecionado um valor de m/z específico de modo a que apenas os iões percursores cuja fragmentação origina iões fragmentos com o valor de m/z selecionado é que são direcionados para o detetor. Deste modo, o varrimento do ião precursor é bastante útil para a identificação de determinadas espécies moleculares com um grupo funcional comum, como é o caso de proteínas fosforiladas e de diferentes classes de lípidos [61, 63].

O varrimento da perda neutra (*neutral loss*) consiste em selecionar um fragmento neutro e detetar todos compostos que perdem essa espécie neutra comum. Neste varrimento o primeiro e o segundo analisador realizam um varrimento sincronizado. Assim como o varrimento do ião precursor, este modo de varrimento também é bastante útil para a identificação de determinadas espécies moleculares com um grupo funcional comum [61, 63].

3.5. Aplicação da Espectrometria de Massa no Estudo de Proteínas e Lípidos

Devido à sua elevada sensibilidade, facilidade de manuseamento e elevada reprodutibilidade, a espectrometria de massa é atualmente a técnica espectroscópica mais utilizada para o estudo quer das proteínas e das modificações a elas associadas, quer do perfil lipídico associado ao desenvolvimento de algumas doenças.

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que apresenta várias vantagens para a identificação de proteínas. Mais concretamente, é uma técnica bastante mais sensível que permite a cobertura de misturas de proteínas e apresenta uma maior reprodutibilidade da amostra identificada. Atualmente, as estratégias metodológicas baseadas na utilização de MS passam primeiro por uma separação. Com a separação em gel mono (1D) ou bidimensional (2D) de proteínas para facilitar a remoção das

proteínas do gel é comum digerir as proteínas através da utilização de uma protease que cliva sequências específicas, como é o caso da tripsina (cliva os resíduos de lisina e arginina do C-terminal das proteínas). A informação obtida da fragmentação dos péptidos obtidos (*peptide mass fingerprint*, PMF) é comparada com as massas teóricas presentes nas bases de dados. Desta forma é identificada a(s) proteína(s) presente(s) numa amostra [60, 61]. Com a utilização de MS/MS e da análise por varrimento de iões percursores ou por varrimento da perda neutra, é possível identificar-se nas proteínas determinadas modificações pós-traducionais. Ou seja é possível identificar resíduos de serina, treonina ou tirosina fosforilados, assim como proteínas nitradas e carboniladas [56, 61].

No estudo de diversas patologias associadas a modificações estruturais de proteínas são vários os estudos que recorrem a espectrometria de massa. Baseler e colaboradores (2010) utilizaram diferentes abordagens proteómicas, como por exemplo electroforese em gel bidimensional com marcação com fluoróforos e posterior identificação por MS, *western blot* para avaliar a alterações do proteoma mitocondrial e suscetibilidade das proteínas a PTMs associadas à diabetes *mellitus* tipo 1. Os resultados deste estudo apontam para uma maior suscetibilidade das mitocôndrias subsarcolemiais às PTMs [64]. Turko e colaboradores (2006), recorrendo às abordagens proteómicas, como a electroforese bidimensional em gel de poliacrilamida, e à utilização da tecnologia de espectrometria de massa MALDI-TOF, realizaram um estudo que pretendia definir as alterações causadas pela diabetes *mellitus* tipo 1 nas mitocôndrias do tecido muscular cardíaco de ratos tratados com STZ. Com este estudo observaram que as proteínas do ciclo de Krebs não sofriam alterações com a diabetes enquanto algumas proteínas dos complexos da cadeia transportadora de eletrões, como por exemplo do complexo I, sofreram uma ligeira diminuição com a diabetes. Observaram também que uma sobre regulação da oxidação dos ácidos gordos favorecia a utilização destes como fonte de acetil-CoA para o ciclo de Krebs. Com os vários resultados obtidos, Turko e colaboradores demonstraram que durante a adaptação do coração à diabetes *mellitus* ocorre uma regulação rápida e altamente coordenada da expressão de proteínas mitocondriais no tecido cardíaco [65].

Para a análise de lípidos por MS é necessário em primeiro lugar extrair a fração lipídica da amostra biológica de interesse. Os métodos de extração de lípidos baseiam-se na utilização de uma mistura de clorofórmio e metanol, que permite a separação para a fase orgânica (clorofórmio) dos lípidos. Os vários métodos de extração existentes diferem entre si na proporção de solventes a utilizar, por exemplo no método de Folch utiliza-se

uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção 2:1 enquanto no método de Bligh and Dyer a mistura de clorofórmio e metanol está na proporção 1:2 [66]. Posteriormente a amostra lipídica está apta para ser analisada por espectrometria de massa. Com a realização de MS é possível obter-se um perfil da composição lipídica da amostra a analisar, enquanto a espectrometria de massa tandem permite obter informações estruturais sobre as espécies moleculares de cada classe lipídica que está presente na amostra. No entanto, em ambas as aplicações de espectrometria de massa as fontes de ionização mais usadas são o ESI e o MALDI, apresentando o ESI relativamente ao MALDI a vantagem de poder ser acoplado a técnicas de separativas como a cromatografia líquida (LC, *liquid chromatography*) [66, 67].

Assim, a realização de MS pode ser feita de duas diferentes maneiras, estando associado a cada uma delas a prévia separação ou não de cada uma das classes lipídicas. Ou seja, a amostra pode ser inserida no espectrómetro de massa sem sofrer separação das classes lipídicas ou então pode ser inserida no espectrómetro de massa pós separação das classes lipídicas por LC [66, 67]. Em ambas as situações, a posterior análise por MS/MS dos principais iões formados permite identificar e caracterizar estruturalmente as espécies moleculares de cada classe lipídica presente na amostra analisada. Na utilização de ESI-MS/MS a informação estrutural de cada uma das classes lipídicas pode ser obtida em diferentes modos, consoante as características dos lípidos. Ou seja, com a ionização no modo positivo é possível ionizar e posteriormente fragmentar as classes lipídicas, como as glicerofosfatidilcolinas e as glicerofosfatidiletanolaminas. Por sua vez, a ionização no modo negativo é possível ionizar e posteriormente fragmentar as classes lipídicas mais ácidas, como as cardiolipinas e o ácido fosfatídico. Outra grande vantagem da utilização de MS/MS consiste na possibilidade de se realizar análise por varrimento de iões percursores ou por varrimento da perda neutra, e assim identificar-se numa mistura lipídica os iões característicos de cada classe de fosfolípidos formados nas fragmentações características de cada classe (Tabela 1) [61].

Tabela 1 – *Precursor ion scanning* (Pre) e *neutral loss scanning* (N-loss) de classes de fosfolípidos no modo positivo e negativo. Adaptado de [68].

Classe	Grupo Polar	Método de Análise	
		Modo Positivo	Modo Negativo
LPC	Colina	<i>Precursor ion scan m/z 184</i>	<i>Neutral loss 60 Da</i>
PC	Colina	<i>Precursor ion scan m/z 184</i>	<i>Neutral loss 60 Da</i>
SM	Colina	<i>Precursor ion scan m/z 184</i>	<i>Neutral loss 60 Da</i>
PE	Etanolamina	<i>Neutral loss 141 Da</i>	<i>Precursor ion scan m/z 196</i>
PI	Inositol	<i>Neutral loss 185 Da</i>	<i>Precursor ion scan m/z 241</i>
PG	Glicerol	<i>Neutral loss 189 Da</i>	<i>Precursor ion scan m/z 153</i>
PS	Serina	<i>Neutral loss 185 Da</i>	<i>Neutral loss 87 Da</i>
PA	Hidrogénio	-	<i>Precursor ion scan m/z 153</i>

Vários estudos têm vindo a ser desenvolvidos recorrendo a este tipo de abordagem metodológica. Nomeadamente, num estudo realizado por Han e seus colaboradores (2007), utilizando uma abordagem de *shotgun lipidomics*, demonstraram que a perda de espécies abundantes cardioplipina em corações de ratos tratados com STZ nas fases mais precoces de diabetes é acompanhada pela remodelação das espécies de cardioplipina [39]. Por sua vez, num outro estudo realizado por Dannenberger e seus colaboradores (2010), foi utilizada a espectrometria de massa (MALDI-TOF) precedida por uma separação cromatográfica (TLC) das classes de lípidos para investigar se o MALDI juntamente com o TOF seriam úteis para o estudo da constituição lipídica de músculo de boi e otimizar qual a melhor matriz a usar para o estudo com MALDI. Neste estudo verificou-se que com o MALDI-TOF obtinham-se picos com sinal intenso para as espécies de CL, PC, PI e PE. Observou-se também que a matriz 9-aminoacridina (9-AA) era a mais adequada para a deteção de fosfolípidos polares enquanto a matriz ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB) era a mais adequada para lípidos apolares como o colesterol [69].

A utilização da espectrometria de massa no estudo da diabetes *mellitus* tipo 1 permite obter informações especialmente importantes para o conhecimento das alterações que ocorrem na estrutura dos lípidos e das alterações das estruturas proteicas associadas ao desenvolvimento e progressão desta patologia [64, 70].

4. Objetivos do Estudo

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica que se caracteriza por uma hiperglicemia crônica resultante da diminuição do *uptake* de glucose pelos tecidos dependentes da insulina, como é o caso do tecido muscular cardíaco [1, 2, 4]. Consequentemente, para sustentar as necessidades energéticas, pode ocorrer a nível celular uma alteração do substrato metabólico levando a uma sobre produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). A nível mitocondrial a exposição excessiva a ROS pode resultar em danos nas proteínas e nos lípidos, culminando na disfunção deste organelo, e consequentemente no desenvolvimento e progressão de patologias como a cardiomiopatia diabética [40]. Deste modo, com vista a uma melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos subjacentes à disfunção mitocondrial cardíaca e, consequentemente, às alterações metabólicas observadas em indivíduos diabéticos tipo 1, o presente projeto teve como objetivo(s):

- i. Avaliar os efeitos da administração de STZ na suscetibilidade dos complexos da cadeia respiratória do músculo cardíaco de ratos diabéticos a modificações pós-traducionais (como a nitração e a carbonilação).
- ii. Avaliar os efeitos da administração de STZ no perfil lipídico das mitocôndrias das células musculares cardíacas.
- iii. Avaliar em que medida é que alterações nas proteínas e lípidos mitocondriais podem contribuir para a disfunção mitocondrial na patogênese da cardiomiopatia diabética.

CAPITULO II
MATERIAL E MÉTODOS

1. Desenho Experimental

De modo a concretizar os objetivos propostos para este estudo delineou-se o desenho experimental apresentado na **Figura 11**, onde estão descritos os grupos experimentais e a abordagem metodológica utilizada que se encontra descrita com maior pormenor nos pontos que se seguem.

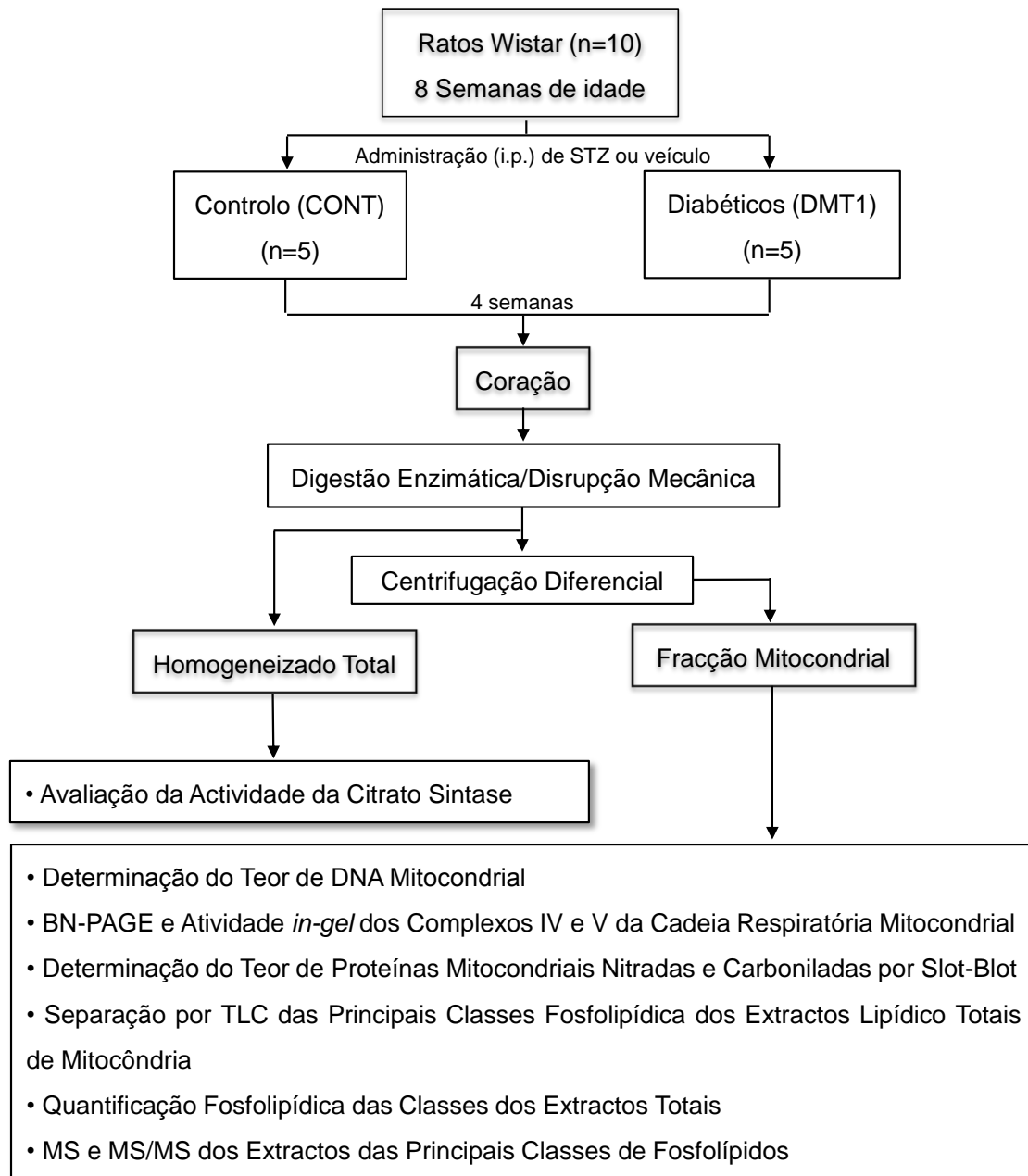


Figura 11 - Esquema representativo da sequência dos procedimentos metodológicos utilizados na análise de diversos parâmetros bioquímicos no músculo cardíaco de ratos *Wistar* diabéticos tipo 1 e controlo.

2. Protocolo Animal

O protocolo experimental foi realizado com 10 ratos machos *Wistar*, com 8 semanas de idade e aproximadamente 200 g de peso corporal, divididos aleatoriamente em dois grupos: controlo e diabético. Os animais diabéticos (n=5) foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com uma única dose de 60 mg/Kg de streptozotocina (STZ) diluída em tampão de citrato de sódio (pH 4,5) e os animais controlo (n=5) foram injetados com o mesmo volume de tampão de citrato de sódio. Após 24 horas da administração de STZ avaliou-se a glicemia e os animais foram considerados diabéticos quando os níveis de glucose no sangue eram superiores a 250 mg/dL. Todos os animais foram mantidos em atmosfera constante (21 – 22 °C; ~50-60 % humidade) num ciclo diário de 12 horas dia - noite, com comida e bebida *ad libitum*. Após 30 dias da administração de STZ ou veículo, os animais foram pesados, avaliou-se a glicemia e de seguida foram sacrificados por deslocamento cervical. Os corações foram extraídos, pesados e posteriormente utilizados para isolamento de mitocôndrias

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as especificações e recomendações do *Guide for Care and Use of Laboratory Animal* do *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR, 1996).

3. Isolamento de Mitocôndrias do Músculo Cardíaco

O isolamento das mitocôndrias do coração foi realizado recorrendo à combinação de ruptura mecânica, digestão enzimática e centrifugação diferencial. Durante o isolamento todos os procedimentos foram realizados a temperaturas entre os 0 e os 4°C.

Os corações foram colocados numa solução de isolamento (250 mM sacarose, 0,5 mM EDTA, 10 mM HEPES, KOH pH 7.4) com 0,1 % de BSA *fat free* e foram seccionados em pequenas porções. Após descartar-se o meio, as secções de tecido cardíaco foram ressuspensas em meio de isolamento contendo protease subtilopeptidase A tipo VIII (1mg de enzima/g de tecido) e homogeneizadas com um *tight-fitting homogenizer*. Posteriormente incubou-se a suspensão a 4 °C durante 1 minuto e centrifugou-se o homogeneizado a 14500 g durante 10 minutos a 4 °C. Seguidamente decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se suavemente o *pellet* em meio de isolamento com o *loose-fitting homogenizer*. A suspensão foi centrifugada a 750 g durante 10 minutos a 4 °C, removendo-se os núcleos (*pellet*). O sobrenadante foi centrifugado a 12,500 g durante 10 minutos a 4 °C e o *pellet* resultante foi ressuspensão suavemente e centrifugado a 12000g durante 10 minutos a 4 °C. Por último,

ressuspendeu-se o *pellet* em meio de lavagem (250 mM sacarose, 10 mM HEPES, KOH pH 7.4), que foi guardado a - 80 °C para posterior utilização.

4. Quantificação da Proteína Total pelo Método RC DC (Bio Rad)

Para a determinação da concentração de proteína total da fração mitocondrial e do homogeneizado total de músculo cardíaco recorreu-se ao método RC DC da Bio-Rad. Este método consiste numa versão modificada do protocolo do teste de Lowry *et al.* (1951) [71], que minimiza a contribuição do material não proteico presente no homogeneizado total e na fração mitocondrial. Neste método, os valores de densidade ótica foram determinados espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 750 nm, tendo-se efetuado em simultâneo uma curva de calibração com padrões de albumina sérica bovina (BSA) com diferentes concentrações.

5. Determinação do Teor de DNA Mitocondrial

O teor de DNA presente na fração mitocondrial foi determinado utilizando o *Quant-iT™ dsDNA BR Assay* da Invitrogen®, utilizando o Qubit® 2.0 Fluorometer. Este ensaio tem como princípio a medição de fluorescência de dsDNA. A concentração de dsDNA nas amostras (µg/mL) calculou-se segundo a equação em que a concentração de dsDNA é igual ao valor obtido no Qubit® 2.0 Fluorometer a multiplicar pelo fator de diluição.

6. Avaliação da Atividade da Citrato Sintase

A atividade da enzima citrato sintase foi medida no homogeneizado total de músculo cardíaco usando o método proposto por Coore *et al* [72]. Neste ensaio a coenzima A (CoASH), libertada da reação entre a acetil-CoA (50 µM) e o oxaloacetato (0,1 mM), foi medida espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 412 nm e com o valor do coeficiente de extinção molar de $\epsilon=13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, através da sua reação com 0,1 mM ácido 5,5'-ditiobis- (2-nitrobenzóico) (DTNB) num tampão Tris-HCl pH 7.4.

7. Separação dos Complexos da Cadeia Respiratória por BN-PAGE

Os complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram separados por electroforese em condições nativas segundo o protocolo descrito por Wittig *et al.* (2006) [73]. Nesse sentido, centrifugou-se um dado volume da fração mitocondrial contendo 400 µg de proteína a 20000 g durante 10 minutos a 4 °C. O pellet de mitocôndrias obtido foi ressuspendido suavemente em 40 µL de tampão de solubilização (50 mM NaCl, 50 mM

Imidazole, 2 mM ácido aminocapróico, 1 mM EDTA, pH 7.0), tendo-se posteriormente adicionado 12 µL de digitonina 20 %. Após uma incubação de 10 minutos em gelo, centrifugou-se a 20000 g durante 20 minutos a 4 °C, recolheu-se o sobrenadante. Ao sobrenadante adicionou-se 5 µL de glicerol 50 % e 6 µL de tampão de enchimento (5 % Coomassie Brilliant Blue G250, 750 mM ácido aminocapróico), tendo-se aplicado 20 µL por poço.

Após a montagem do sistema de electroforese aplicou-se uma corrente de 75 V durante 1 hora a 4 °C, permitindo a entrada das amostras no gel. De seguida, mantendo o sistema montado, substitui-se o tampão do cátodo com cor pelo tampão do cátodo sem cor. Após a substituição do tampão aplicou-se uma corrente de 200 V durante aproximadamente 3 horas a 4 °C, até se observar a saída do corante do gel. Terminada a corrida, o gel foi corado com azul de Coomassie coloidal ou usado para a avaliação da atividade *in-gel* dos complexos IV e V da cadeia respiratória mitocondrial ou então usados para a determinação do teor de nitração ou do teor de grupos carbonilos.

Para a deteção das proteínas separadas, recorreu-se ao método de coloração com Coomassie coloidal. Assim, o gel foi fixado durante 1 hora numa solução de fixação (10 % ácido acético, 40 % metanol). Posteriormente colocou-se o gel numa solução de Coomassie Coloidal G250 (0,12 % (m/v) em 20 % metanol), deixando-se a corar durante a noite com agitação. Uma vez removida a solução corante, o gel foi lavado com água destilada e colocado na solução descorante (25 % metanol) até o desaparecimento do ruído de fundo. Os géis foram digitalizados e analisados com o software QuantityOne (Bio-Rad).

8. Avaliação da Atividade *in-gel* dos Complexo IV e V da Cadeia Respiratória Mitocondrial

Após a separação dos complexos da cadeia respiratória por BN-PAGE, incubou-se o gel com uma solução específica para o complexo IV contendo DAB (15 mg DAB em 9 mL de tampão fosfato 0,05 mM pH 7.4) e citocromo c reduzido (30 mg) a 37 °C durante a noite. Posteriormente fixou-se o gel durante 15 minutos numa solução de 50 % de metanol com 10 % ácido acético. O gel foi mantido em água até ser digitalizado no Molecular Imager Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) e posteriormente analisado.

Para avaliar a atividade *in-gel* do complexo V da cadeia respiratória mitocondrial, após a separação dos complexos por BN-PAGE colocou-se o gel numa solução contendo 0,11 g Tris-HCl, 0,51 g glicina, 42 mg MgSO₄, 50 mg Pb(NO₃)₂ e 0,11 g ATP, pH 7.4 e

incubou-se a 37 °C durante a noite Posteriormente o gel foi colocado em água até poder ser digitalizado.

9. Avaliação Espectrofotométrica da Atividade do Complexo III da Cadeia Respiratória Mitocondrial

Para a determinação espectrofotométrica da atividade do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial, frações mitocondriais foram colocadas em meio hipotônico (25 mM fosfato de potássio, pH 7,2) para induzir a rutura das mitocôndrias [74]. A atividade do complexo III foi medida a 550 nm ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) numa mistura contendo tampão de reação (50 mM fosfato de potássio, pH 7,4; 5 mM MgCl_2 , e 1 mg BSA/ml), 1 μg de mitocôndrias sonicadas, 20 μM rotenona, 2 mM KCN, 0,2 mM de ATP, e 40 μM citocromo c. A reação foi iniciada pela adição de 100 μM decilbenzoquinol com ou sem 7,4 μM antimicina A. A atividade foi medida pela subtração do valor obtido na presença de antimicina A ao valor de atividade obtido na ausência do inibidor [75].

10. Determinação do Teor de Proteínas Mitocondriais Nitradas e Carboniladas por Slot-Blot

A determinação do teor de grupos carbonilos nas proteínas mitocondriais baseou-se no protocolo descrito por Robinson *et al.* [76].

Um determinado volume de fração mitocondrial de músculo cardíaco de ratos controlo e diabético contendo 20 μg de proteína foi diluído em TBS (Tris 100 mM pH 8,0, NaCl 1,5 mM) perfazendo o volume de 50 μL (V). A estas amostras adicionou-se um volume (1V) de 12 % de SDS e dois volumes (2V) de 20 mM de dinitrofenilhidrazina (DNPH) preparada em 10 % TFA, seguindo-se uma incubação de 30 minutos no escuro. Após este período, procedeu-se à neutralização com 1,5 volumes (1,5V) de 2 M de Tris e 18% de β -mercaptoetanol. Posteriormente diluíram-se as amostras numa solução de TBS de forma a obter concentrações diferentes (0,0044 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,0022 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,0005 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Transferiu-se um volume de 100 μL por *slot-blot* para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®) pré-ativada numa solução 10 % metanol e lavada em água.

Para determinação do teor de nitrção, dilui-se um determinado volume de fração mitocondrial de músculo cardíaco de rato controlo e de rato diabético em TBS de modo a obter as seguintes concentrações: 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente, transferiu-se um volume de 100 μL por *slot-blot* para uma membrana de nitrocelulose (Millipore®) pré-ativada numa solução 10 % metanol e lavada em água.

Após aplicação das amostras nas membranas, procedeu-se ao bloqueamento dos locais de ligação não específica com uma solução de 5 % leite em pó magro em TBS-T (Tris 100 mM pH 8,0, NaCl 1,5 mM, 0,5 % de Tween 20) durante a noite a 4 °C, seguindo-se a incubação da membrana com o anticorpo primário (*rabbit* policlonal anti-DNP (1:2000, DakoCytomation®) para análise dos grupos carbonilos e *mouse* monoclonal anti-3-nitrotirosina (1:1000, cat. 06-284, Millipore®) para a análise do teor de nitração) durante 2 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T procedeu-se à incubação das membranas com anticorpo secundário anti-*rabbit* IgG-Peroxidase ou anti-*mouse* IgG-Peroxidase (1:2000, Amersham Pharmacia Biotech®) por um período de 2 horas. Após novas lavagens com TBS-T, procedeu-se à imunodeteção das bandas utilizando o reagente de quimioluminescência ECL (Amersham Pharmacia Biotech®), de acordo com as instruções do fabricante, e exposta a um filme de raio X (Kodak Biomax Light Film, Sigma®). Os filmes foram digitalizados num Molecular Imager Gel Doc XR+ System (Bio-Rad) e analisados com o *software* QuantityOne (BioRad®).

11. Extração de Lípidos das Membranas Mitocondriais

Na extração dos lípidos das membranas das mitocôndrias isoladas do tecido muscular cardíaco utilizou-se o método descrito por *Bligh e Dyer* (*Bligh and Dyer 1959*) [77]. Segundo este método, por cada 1 mL de amostra (correspondente a aproximadamente 8 mg de proteína) pipetado para um tubo de vidro adicionou-se-lhe 3,75 mL de uma solução de clorofórmio:metanol 1:2 (v/v). Agitou-se bem e colocou-se a amostra em gelo durante 30 minutos. Posteriormente adicionou-se, por cada mL de amostra, 1,25 mL de clorofórmio e 1,25 mL de água, tendo-se agitado bem após cada adição. Paralelamente preparam-se em, igual número, tubos contendo água em vez de amostra e adicionou-se 3,75 mL de uma solução de clorofórmio:metanol 1:2 (v/v), 1,25 mL de clorofórmio e 1,25 mL de água, tendo-se agitado bem após cada adição. Todos os tubos foram sujeitos a uma centrifugação de 1000 rpm durante 5 minutos. A fase orgânica dos tubos da amostra foi adicionada à fase aquosa dos tubos branco, sendo posteriormente centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos. Realizou-se este passo de modo a eliminar possíveis impurezas contidas na fase orgânica que continha a amostra de interesse. Posteriormente, a fase orgânica contendo a amostra foi recolhida com cuidado e colocada em tubos mais pequenos e deixada a secar. Por fim, as amostras de fosfolípidos foram guardadas a -20 °C para posterior utilização.

12. Separação de Lípidos por TLC-1D

Na separação de lípidos por TLC-1D começou-se por fazer uma pré-lavagem da placa de TLC de sílica gel 60 com zona de concentração 2.5×20 cm (Merck), até aproximadamente 1cm do topo, numa câmara com clorofórmio/metanol (1:1). Depois secou-se a placa na hotte durante 10 a 15 minutos. Depois de seca, borrifou-se a placa com uma solução de 2,3 % (m/v) de ácido bórico em etanol. Colocou-se a placa a secar na hotte durante 5 a 10 minutos e levou-se à estufa (100 °C) durante 15 minutos. Aplicaram-se as amostras na placa de TLC, cada aplicação correspondente a 20 µL de uma solução com uma concentração de lípido total de 1,5 µg/µL. Secou-se a placa com uma ligeira corrente de azoto e colocou-se numa câmara pré-saturada com uma solução de clorofórmio/etanol/água/trietilamina (30/35/7/35, v/v), durante aproximadamente 2 horas. Após estar seca a placa foi borrifada com primulina e posteriormente foi seca e colocada numa câmara de revelação.

13. Determinação Quantitativa de Fosfolípidos

Aos *spots* previamente separados por TLC e correspondentes a cada classe de fosfolípidos, depois de raspados individualmente das placas de TLC foram transferidas para tubos de vidro e levadas à evaporação completa por corrente de azoto. Terminada a evaporação, adicionou-se 0,650 mL de ácido perclórico concentrado (70 %) e colocaram-se os tubos num bloco de aquecimento a 180 °C durante 30 minutos, ou até o desaparecimento da cor amarela. Depois de frio, adicionou-se aos tubos 3,3 mL de água ultrapura, 0,500 mL de solução de molibdato de amónia (2,5 g em 100 mL de água) e 0,500 mL de solução de ácido ascórbico (10 g em 100 mL de água) preparadas de fresco, tendo-se agitado no vortex depois de cada adição. Os padrões (de 1 a 5 µg de fosfato por tubo) foram preparados de modo idêntico às amostras mas com a exceção do aquecimento a 180 °C. Todos os tubos foram colocados num banho de água a 100 °C durante 5 minutos. Após este período de aquecimento, retiraram-se os tubos da fonte de aquecimento e, quando a solução ficou fria, procedeu-se à leitura da absorvância das amostras a 800 nm. Deste modo, após a representação gráfica da absorvância em função da quantidade de fosfato, a quantidade de fosfolípidos (em µg) presentes na amostra foi calculada multiplicando por a quantidade de fosfato 25. A percentagem de cada classe fosfolipídica foi calculada relativizando a quantidade de fosfolípido em cada *spot* do TLC pela quantidade de amostra aplicada no TLC, dando assim a % relativa de cada classe fosfolipídica na amostra.

14. Análise e Identificação de Lípidos por Espectrometria de Massa

Após a separação das classes de fosfolípidos por TLC, os extratos de cada classe de fosfolípidos foram analisados por espectrometria de massa utilizando-se para tal dois espectrômetros de massa diferentes com fonte ionização por *electrospray*: um *electrospray-linear ion trap* e um *electrospray-triplo* quadrupólo (ESI-QqQ).

A aquisição de espectros de ESI-QqQ no instrumento Quattro Premier XE (Micromass, *Manchester, UK*) foi realizada no modo positivo segundo as seguintes condições: fluxo de entrada da amostra de 10 a 20 µl/min, a voltagem aplicada na agulha de 3,5 kV, uma temperatura capilar de 300 °C e um fluxo de gás de 32 unidades. Os espectros de *full scan* MS, de *neutral loss* e de *parent scan* foram adquiridos com um tempo de aquisição máximo de 50 ms a 200 ms tendo a energia de colisão utilizada variado entre 20-30 V. Para o tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software MassLynx* (versão 4.0).

O espectrômetro de massa trapa de iões linear LXQ (*ThermoFinnigan, Palo Alto, USA*) foi utilizado em modo positivo, com as seguintes condições de *electrospray*: fluxo de entrada da amostra de 8 µl/min, voltagem do *electrospray* de 5 kV; temperatura do capilar de 275 °C, o fluxo do gás de 25 unidades. No modo negativo as condições utilizadas foram as mesmas com a exceção da voltagem do *electrospray* de 4,7kV, e da temperatura do capilar de 275 °C. Foram realizados espectros de MS² nos iões de interesse, variando a energia de colisão entre 18 – 30 de unidades arbitrárias. Para o tratamento de resultados foi utilizado o programa de *software Xcalibur* (V2.0).

15. Análise Estatística

Todas as variáveis analisadas apresentaram uma distribuição normal, segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov. Por essa razão, todos os resultados deste trabalho foram processados recorrendo aos testes estatísticos paramétricos. A média e o desvio padrão foram calculados para todas as variáveis de cada um dos grupos experimentais. Para testar a diferenças entre estes grupos experimentais efetuou-se uma análise de variância multifatorial *One-way ANOVA* seguida da aplicação do teste Bonferroni de comparação entre pares de colunas selecionadas. O cálculo dos dados foi efetuado com o *software GraphPad Prism5*. O nível de significância estabelecido foi de 5 %.

CAPITULO III
RESULTADOS

1. Caracterização do Modelo Animal Utilizado de Diabetes *Mellitus* Tipo 1

De modo a estudar os efeitos da diabetes *mellitus* tipo 1 (DMT1) na plasticidade mitocondrial, utilizou-se um modelo animal cuja diabetes foi induzida pela administração intraperitoneal de 60 mg/Kg de streptozotocina (STZ) em ratos Wistar. Após 4 semanas de administração de STZ (ou de veículo, no caso dos animais controlo), avaliaram-se os valores do peso corporal, da glicemia e dos níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) (**Tabela 2**). Os animais foram considerados diabéticos para valores de glicemia superiores a 250 mg/dL, o que se verificou em todos os animais do grupo experimental DMT1. Nestes animais observou-se também uma diminuição significativa do peso corporal (33 %), que consubstancia o perfil diabético destes animais [78, 79].

Tabela 2 – Efeito da DMT1 na glicémia, hemoglobina glicada e peso corporal. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

<i>Parâmetros</i>	<i>Grupo experimental</i>	<i>CONT</i>	<i>DMT1</i>
Glicemia (mg/dL)		76,0 \pm 6,0	323,5 \pm 11,7 ^{***}
HbA1c (%)		5,6 \pm 0,3	8,3 \pm 0,1 ^{***}
Peso Corporal (g)		326,8 \pm 12,5	217,8 \pm 14,6 ^{**}

^{**} <0,05 vs. CONT; ^{***} <0,001 vs. CONT

A hiperglicemia observada nos animais diabéticos foi consistente com o aumento da percentagem de hemoglobina glicada (48 %), traduzindo assim a condição de diabetes [79].

Imediatamente após o sacrifício dos animais, o tecido cardíaco foi pesado e as mitocôndrias deste tecido foram isoladas. Determinaram-se os valores de DNA mitocondrial (mtDNA) e de proteína mitocondrial (mtProteína) do tecido muscular cardíaco em ambas as condições experimentais, tendo sido posteriormente normalizados à massa do coração. Assim, na **Tabela 3** encontram-se registados os valores obtidos para os rácios massa de coração/peso corporal, mtDNA/massa de coração e mtProteína /massa de coração.

Tabela 3 - Efeito da diabetes *mellitus* nos rácios massa de coração/peso corporal, mtDNA/massa de coração e mtProteína/massa de coração. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

<i>Parâmetros</i>	<i>Grupo experimental</i>	<i>CONT</i>	<i>DMT1</i>
Massa de coração/Peso corporal (mg/g)		3,19 \pm 0,08	4,86 \pm 0,48*
mtDNA/massa de coração (μg/g)		23,4 \pm 6,3	21,9 \pm 6,5
mtProteína/massa de coração (μg/g)		13,8 \pm 2,6	13,8 \pm 2,3
Massa de coração (g)		1,04 \pm 0,01	1,08 \pm 0,16

* < 0,01 vs. CONT

O aumento do rácio massa de coração/peso corporal nos animais diabéticos sugere que a diminuição de peso corporal observada nestes animais (**Tabela 2**) não foi acompanhada por uma diminuição da massa do coração. De forma a avaliar o efeito da DMT1 na quantidade de mitocôndrias do músculo cardíaco determinou-se as razões mtDNA/massa de coração e mtProteína/massa de coração, não se tendo observado diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Adicionalmente mediu-se a atividade da enzima citrato sintase no extrato total de homogeneizado do tecido muscular cardíaco (**Figura 12**).

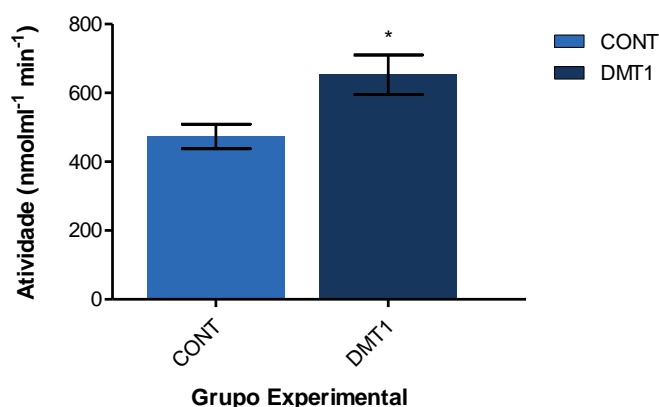


Figura 12 – Efeito da administração de STZ na atividade da enzima citrato sintase avaliada no tecido cardíaco. (* <0,01 vs. CONT)

A análise integrada dos dados dos rácios mtDNA/massa de coração, mtProteína/massa de coração e atividade da enzima citrato sintase permite constatar que no músculo cardíaco dos animais DMT1 há um aumento da atividade da citrato sintase mas não do número de mitocôndrias.

2. Avaliação da Plasticidade da Cadeia Respiratória Mitocondrial

Uma vez validado o modelo animal utilizado para estudar a diabetes tipo 1, avaliou-se o efeito da administração de STZ na organização dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Para tal procedeu-se à análise por BN-PAGE das frações mitocondriais isoladas do músculo cardíaco de animais controlo e diabéticos (**Figura 13**). A análise da imagem representativa do gel BN-PAGE apresentado **Figura 13A** não evidencia diferenças qualitativas nem quantitativas na organização dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial induzidas pela administração de STZ.

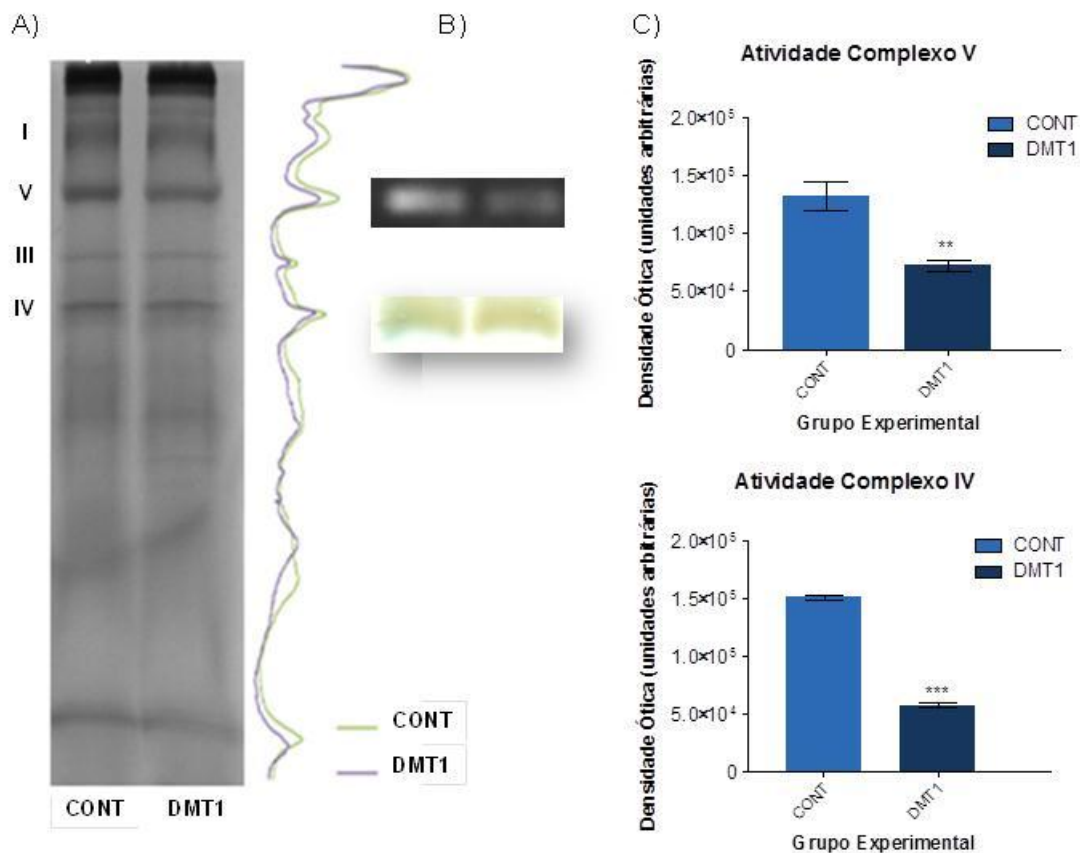


Figura 13 – Efeito da administração de STZ na abundância relativa e na organização supramolecular da cadeia respiratória mitocondrial cardíaca. (A) BN-PAGE representativo da separação dos complexos da fosforilação oxidativa com representação à direita da sobreposição da variação de densidade ótica das bandas de ambos os grupos experimentais. (B) Imagem representativa da marcação histoquímica subjacente à atividade *in-gel* dos complexos IV e V e (C) avaliação quantitativa da atividade dos complexos IV e V. (** <0,05 vs. CONT; *** <0,001 vs. CONT)

Apesar de em termos quantitativos e qualitativos não se terem observado diferenças consideráveis na abundância e organização dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial entre os dois grupos experimentais, observaram-se diferenças

da atividade *in-gel* dos complexos IV e V (**Figura 13B**). Através da análise da **Figura 13C** é possível observar-se uma considerável diminuição da atividade do complexo IV (62 %) e do complexo V (45 %) apenas 4 semanas após da administração de STZ.

Adicionalmente, avaliou-se espectrofotometricamente a atividade do complexo III, tendo sido observada uma diminuição da atividade deste complexo associada à diabetes, embora não estatisticamente significativa (**Figura 14**).

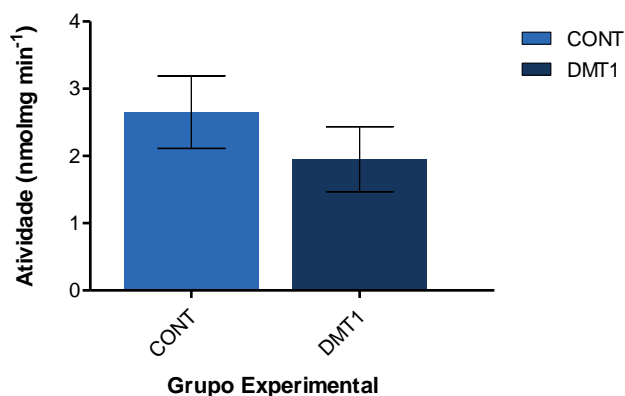


Figura 14 – Efeito da administração de STZ na atividade do complexo III da cadeia respiratória mitocondrial avaliada no tecido cardíaco.

Com o objetivo de verificar se a diminuição da funcionalidade mitocondrial associada à diabetes *mellitus* tipo 1 (**Figura 13**) estaria relacionada com um aumento da suscetibilidade das proteínas mitocondriais à lesão oxidativa, avaliou-se por *slot-blot* os níveis de proteínas mitocondriais carboniladas e nitradas (**Figura 15**).

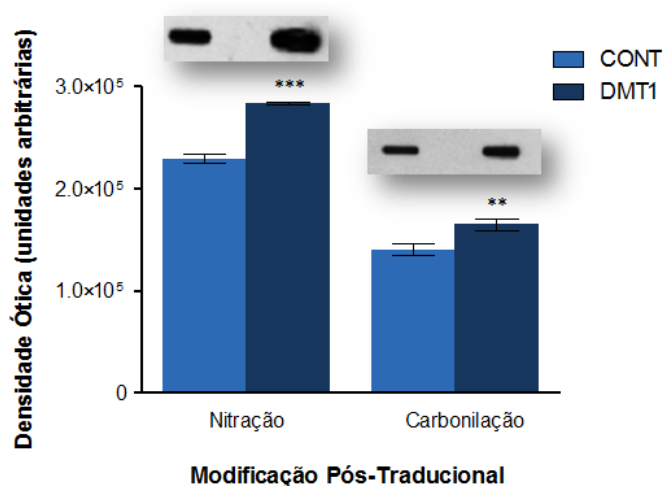


Figura 15 – Efeito da administração de STZ no teor de proteínas mitocondriais carboniladas e nitradas, avaliadas por *slot-blot*. (** <0,05 vs. CONT; *** <0,001 vs. CONT)

Pela análise da **Figura 15** observa-se efetivamente um aumento significativo de proteínas mitocondriais nitradas (23 %) e carboniladas (17 %) em indivíduos diabéticos, apenas 4 semanas após a administração de STZ.

3. Avaliação do Perfil Lipídico Mitocondrial do Músculo Cardíaco na Diabetes *Mellitus* Tipo 1

3.1. Separação por TLC e Quantificação de Classes de Fosfolípidos

Para se avaliar o efeito da administração de STZ no perfil lipídico das membranas mitocondriais de células do tecido muscular cardíaco, separaram-se por TLC os fosfolípidos correspondentes às diferentes classes presentes nos extratos lipídicos totais de mitocôndrias de coração de animais controle e diabéticos tipo 1.

Na **Figura 16** é apresentada uma imagem representativa do TLC obtido. Com esta abordagem foi possível separar os lípidos das membranas mitocondriais de tecido muscular cardíaco pertencentes às seguintes classes: glicerofosfolípidos (CL, PE, PC, PI, PG e LPC) e esfingolípidos (SM e Ceramidas). A identificação dos *spots* na placa de TLC correspondentes a cada classe de lípidos foi realizada por comparação com *spots* de padrões aplicados na placa de TLC e posteriormente por análise dos lípidios de cada *spot* por espectrometria de massa.

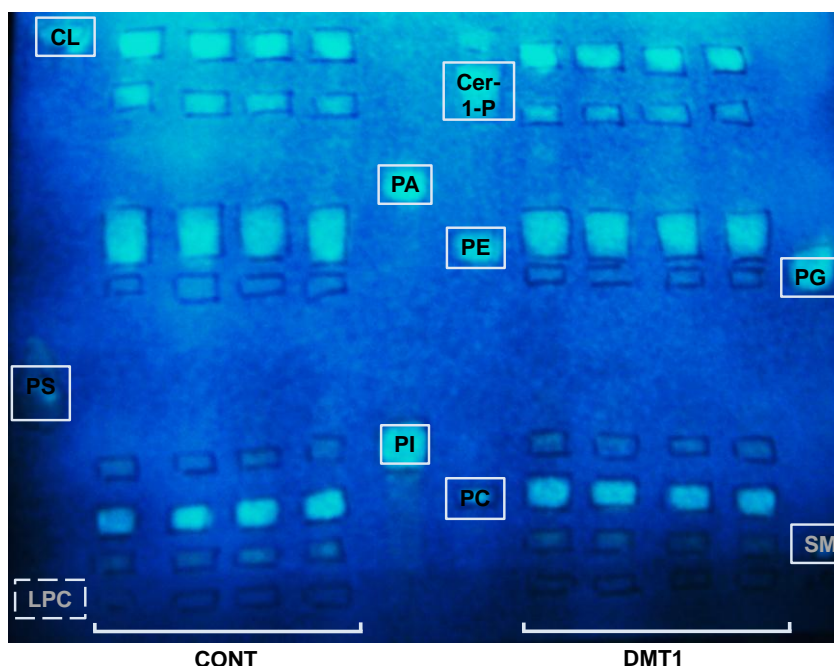


Figura 16 – Separação por TLC das principais classes de lípidos obtidos após fracionamento de extratos lipídicos totais de mitocôndrias de tecido muscular cardíaco de ratos controle (CONT) e

de ratos diabéticos (DMT1). (Cer-1-P: ceramida-1-fosfato, CL: cardiolipina, Pa: ácido fosfatídico, PE: glicerofosfatidiletanolamina, PG: glicerofosfatidilglicerol, PS: glicerofosfatidilserina, PI: glicerofosfatidilinositol, PC: glicerofosfatidilcolina, SM: esfingomielina, LPC: lisofosfatidilcolina).

A percentagem relativa de cada classe no extrato lipídico total de mitocôndrias do tecido cardíaco foi avaliada através da determinação espectrofotométrica da quantidade de fosfato em cada *spot* de cada classe de fosfolípidos (**Figura 17**).

As classes que se verificaram ser as mais abundantes nas membranas mitocondriais foram as glicerofosfatidilcolinas, as glicerofosfatidiletanolaminas e as cardiolipinas. Verificou-se ainda que as glicerofosfatidilcolinas e as glicerofosfatidiletanolaminas estão em maior percentagem (34,5 % e 34,3 %, respetivamente) do que a cardiolipina (11,3 %).

Da análise da **Figura 17** é ainda de destacar o aumento da percentagem relativa das classes de lípidos mais abundantes nas mitocôndrias cardíacas dos animais diabéticos (PC aumenta 11,6 %, PE aumenta 5 % e a CL aumenta 10,6 %). As classes de lípidos menos abundantes diminuem ligeiramente em DMT1, quando comparado com CONT.

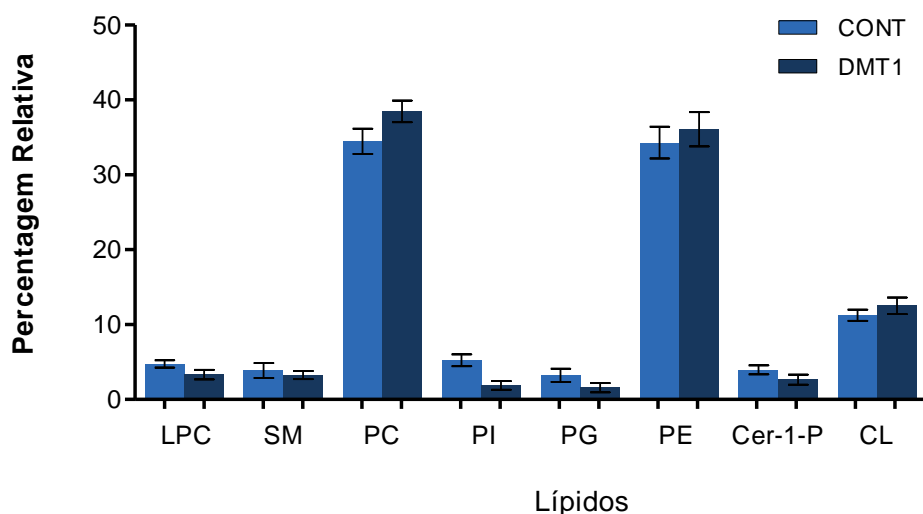


Figura 17 – Percentagem relativa das diferentes classes de lípidos mitocondriais, separados por TLC de extratos lipídicos totais de ratos controlo e de ratos diabéticos. (Cer-1-P: ceramida-1-fosfato, CL: cardiolipina, Pa: ácido fosfatídico, PE: fosfatidiletanolamina, PG: fosfatidilglicerol, PI: fosfatidilinositol, PC: fosfatidilcolina, SM: esfingomielina, LPC: lisofosfatidilcolina).

A fim de se avaliar as principais alterações no perfil molecular dentro de cada classe de fosfolípidos associados à administração de STZ analisaram-se os extratos de lípidos das mitocôndrias isoladas do músculo cardíaco por espectrometria de massa

(MS). Esta análise foi ainda complementada com a avaliação por espectrometria de massa tandem (MS/MS) da composição em grupos acil de cada uma das espécies moleculares identificadas para cada uma das classes extraídas dos *spots* obtidos do TLC.

3.2. Análise das Classes de Fosfolípidos por Espectrometria de Massa

As classes de fosfolípidos extraídas dos *spots* obtidos do TLC foram analisadas por ESI-MS e por MS/MS. As classes das CL's, PI's e PG's foram analisadas por espectrometria de massa no modo negativo enquanto as classes PC's, PE's e SM's foram analisadas por espectrometria de massa no modo positivo.

3.2.1. Análise de Espectros de MS no Modo Negativo

3.2.1.1. Cardiolipina

Das classes analisadas por MS no modo negativo, a cardiolipina (CL) é a que se encontra na mitocôndria em maior abundância. Este fosfolípido possui quatro grupos acil, três gliceróis e dois grupos fosfato na sua estrutura (**Figura 4**), tornando mais complexa a análise dos seus espectros de MS/MS, comparativamente com as outras classes.

Os extratos obtidos a partir dos *spots* obtidos do TLC correspondentes às cardiolipinas, do estudo dos animais controlo e diabéticos, foram analisadas por MS, sendo possível identificar as diferentes espécies moleculares desta classe de fosfolípidos no espectro de MS, pela presença de iões com carga unitária $[M-H]^-$ e/ou com carga dupla $[M-2H]^{2-}$. Na **Figura 18** encontram-se representados os espectros de MS obtidos para a cardiolipina dos grupos CONT (**Figura 18A**) e DMT1 (**Figura 18B**).

Em ambos os espectros representados na **Figura 18** verifica-se que a espécie molecular mais abundante corresponde ao ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 1447, correspondente à cardiolipina $(C18:2)_4$ e cuja respetiva espécie com carga dupla $[M-2H]^{2-}$ corresponde ao ião com valor de m/z 723 $((C18:2)_4)$. A comparação dos espectros de MS de cada uma das condições experimentais permitiu constatar uma maior abundância do ião $M-H]^-$ com valor de m/z 1543 correspondente à CL $(C18:2/C18:2/C22:6/C22:6)$ no espectro da condição de ratos diabéticos.

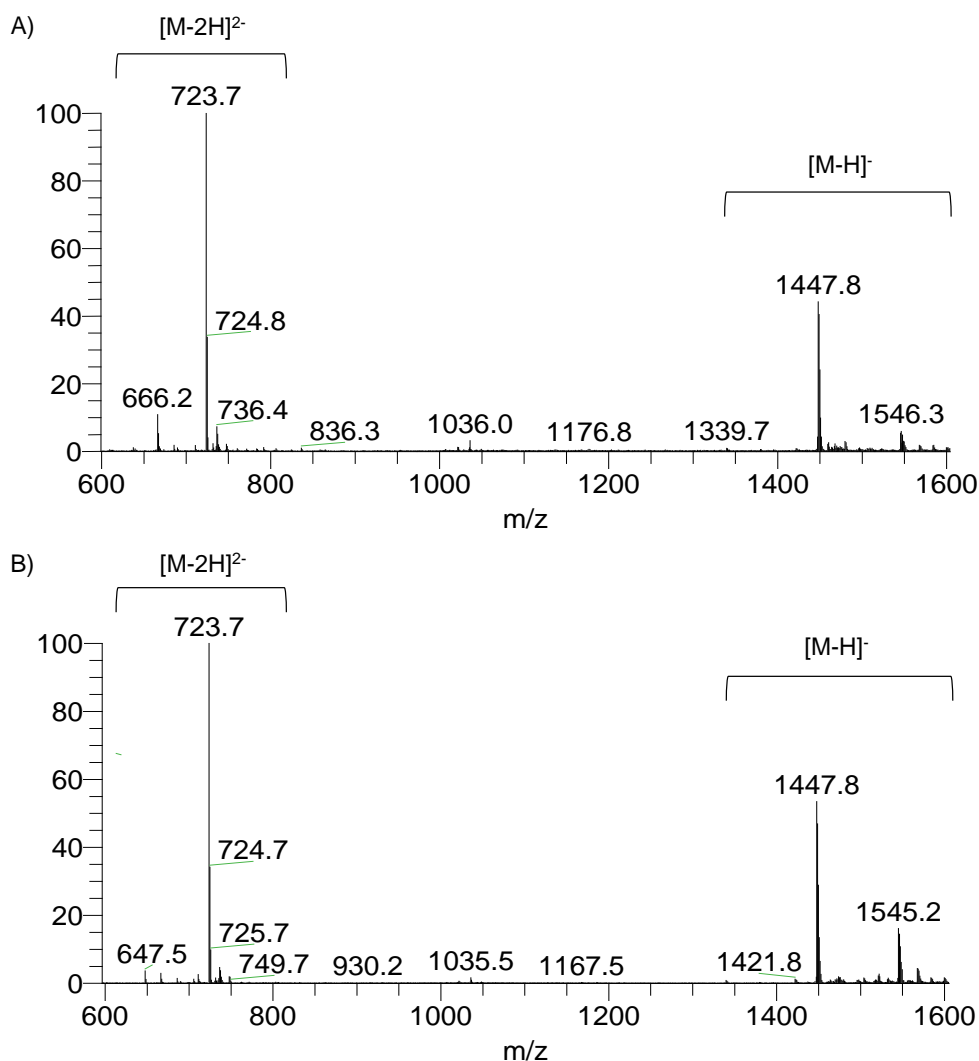


Figura 18 – Espectros ESI-MS modo negativo de extratos de CL separadas por TLC, de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos.

Na **Tabela 4** estão representadas as espécies moleculares de cardiolipina identificadas por MS/MS no modo negativo, assim como a respetiva composição em ácidos gordos.

Verifica-se que a maioria das espécies moleculares apresenta o ácido palmitoleico (C16:1), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2) como principais constituintes das suas cadeias acil. As cadeias acil mais suscetíveis a oxidação são aqueles que possuem um nível de insaturações mais elevado, como é o caso do ácido araquidónico (C20:4), do ácido docosatetraenónico (C22:4), do ácido docosapentaenónico (C22:5) e do ácido docosahexaenónico (C22:6) [80, 81]. No entanto, apenas se verificou a oxidação da espécie molecular $[M-H]^{-}$ de cardiolipina com valor de m/z 1447 que em termos de grupos acil, apenas possui na sua estrutura o ácido linoleico (C18:2). Resultantes desta oxidação

foi observado tanto no grupo CONT como no grupo DMT1 a presença das espécies moleculares $[M-H]^-$ com valor de m/z 1463 e de m/z 1479, correspondentes às CL oxidadas com a inserção de um e dois átomos de oxigénio ((C18:2/C18:2/C18:2/**C18:2+O**) e (C18:2/C18:2/**C18:2+O/C18:2+O**)), respetivamente. Assim, a presença das espécies moleculares de CL com valor de m/z 1463 e de m/z 1479 em ambos os grupos experimentais, sugere que 4 semanas após a administração de STZ não ocorre oxidação lipídica nesta classe fosfolipídica.

Tabela 4 – Cardiolipinas identificadas e analisadas por ESI-MS e por ESI-MS/MS no modo negativo de mitocôndrias isoladas de ratos controlo e de ratos diabéticos tipo 1.

$[M-H]^-$ m/z	$[M-2H]^{2-}$ m/z	C:N	Composição em Ácidos Gordos
1379	689	66:8	18:2/18:2/18:2/12:2+O
1421	710	70:7	18:2/18:2/18:2/16:1
1447	723	72:8	18:2/18:2/18:2/18:2
1463	731	72:8	18:2/18:2/18:2/18:2+O
1473	736	74:9	18:2/18:2/18:2/20:3 18:1/18:2/18:2/20:4
1479	739	72:8	18:2/18:2/18:2+O/18:2+O
1495	747	76:12	18:2/18:2/18:2/22:6
1499	749	76:10	18:2/18:2/18:2/22:4 18:1/18:2/18:2/22:5
1543	771	80:16	18:2/18:2/22:6/22:6

A identificação das espécies acil dos iões de cardiolipina indicados na **Tabela 4** foi efetuada pela interpretação direta dos espectros de MS/MS adquiridos no modo negativo para cada um dos iões tabelados. Na **Figura 19A** encontra-se representado o espectro característico da espécie molecular $[M-H]^-$ com valor de m/z 1447 (CL (C18:2)₄), assim como a sua respetiva fragmentação (**Figura 19B**). No espectro de MS/MS adquirido para esta espécie molecular de CL pode-se visualizar os iões produto que se formam na fragmentação (**Figura 19**). Nomeadamente, o $[M-H-R_1COOH]^-$, o ácido fosfatídico ([PA-

H⁻], o PA com o glicerol ([PA+56-H]⁻), com o glicerofosfato ([PA+136-H]⁻) e sem um ácido gordo ([PA-H-R₂'COOH]⁻) e as quatro espécies acil ([RCOO]⁻) [82, 83].

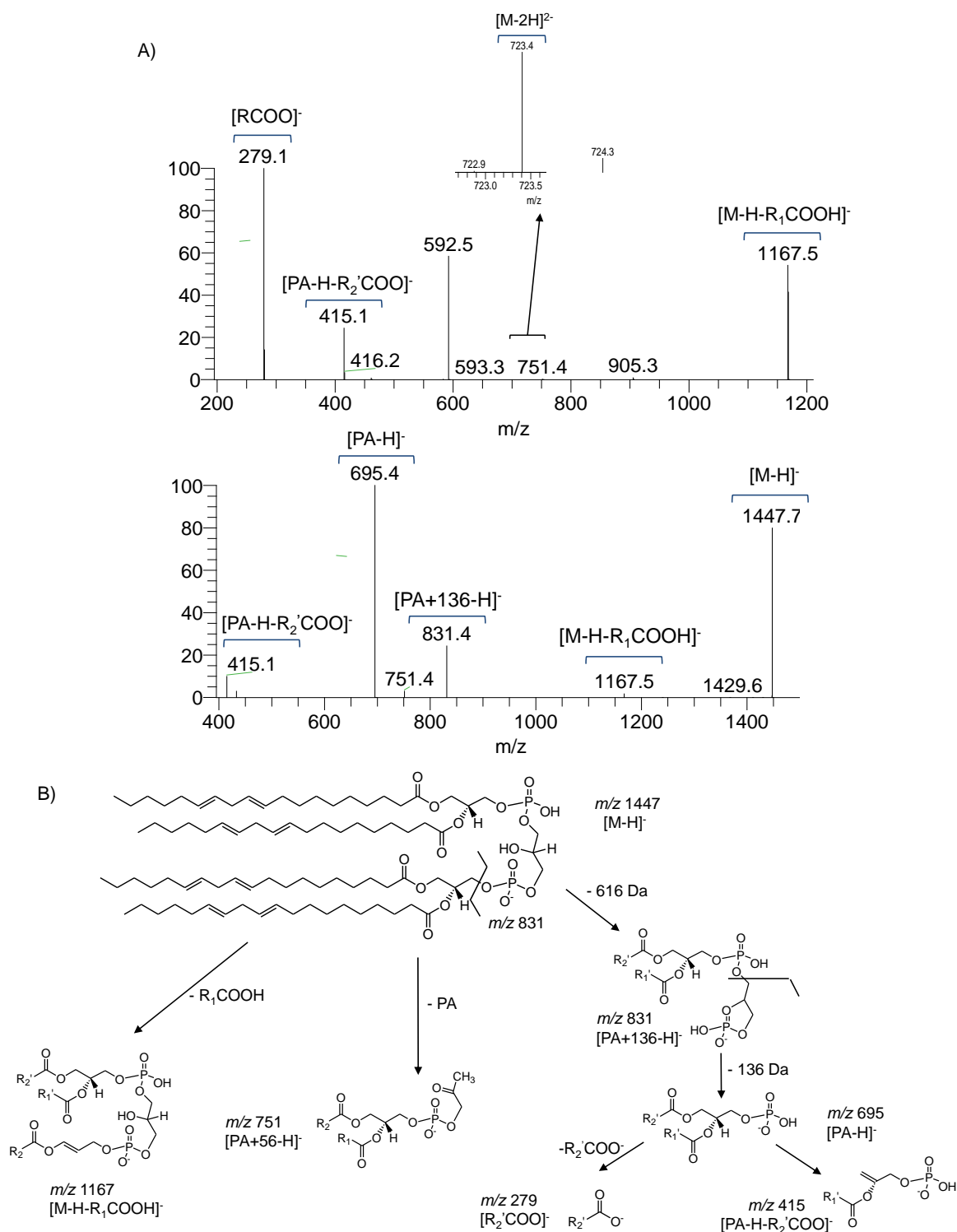


Figura 19 – A) Espectros de MS/MS do ião [M-H]⁻ com m/z 1447 e [M-2H]²⁻ com m/z 723 correspondente à CL (C18:2)₄ presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B)

Fragmentações características verificadas na cardiolipina $[M-H]^-$ com valor de m/z 1447 com formação dos íons produto $[M-H-R_1COOH]^-$, $[PA+56-H]^-$, $[PA+136-H]^-$, $[PA-H-R_2'COOH]^-$ e $[PA-H]^-$.

Após a análise das cardiolipinas por MS no modo negativo, também se procedeu ao mesmo tipo de abordagem para as classes que se verificaram ser menos abundantes na mitocôndria, nomeadamente as PG's e as PI's.

3.2.1.2. Glicerofosfatidilglicerol

Os espectros de MS das glicerofosfatidilglicerol extraídas dos *spots* obtidos do TLC foram adquiridos no modo negativo (**Figura 20**), encontrando-se representados na **Figura 20A** os espectros de MS adquiridos para o grupo CONT e na **Figura 20B** os espectros de MS adquiridos para o grupo DMT1.

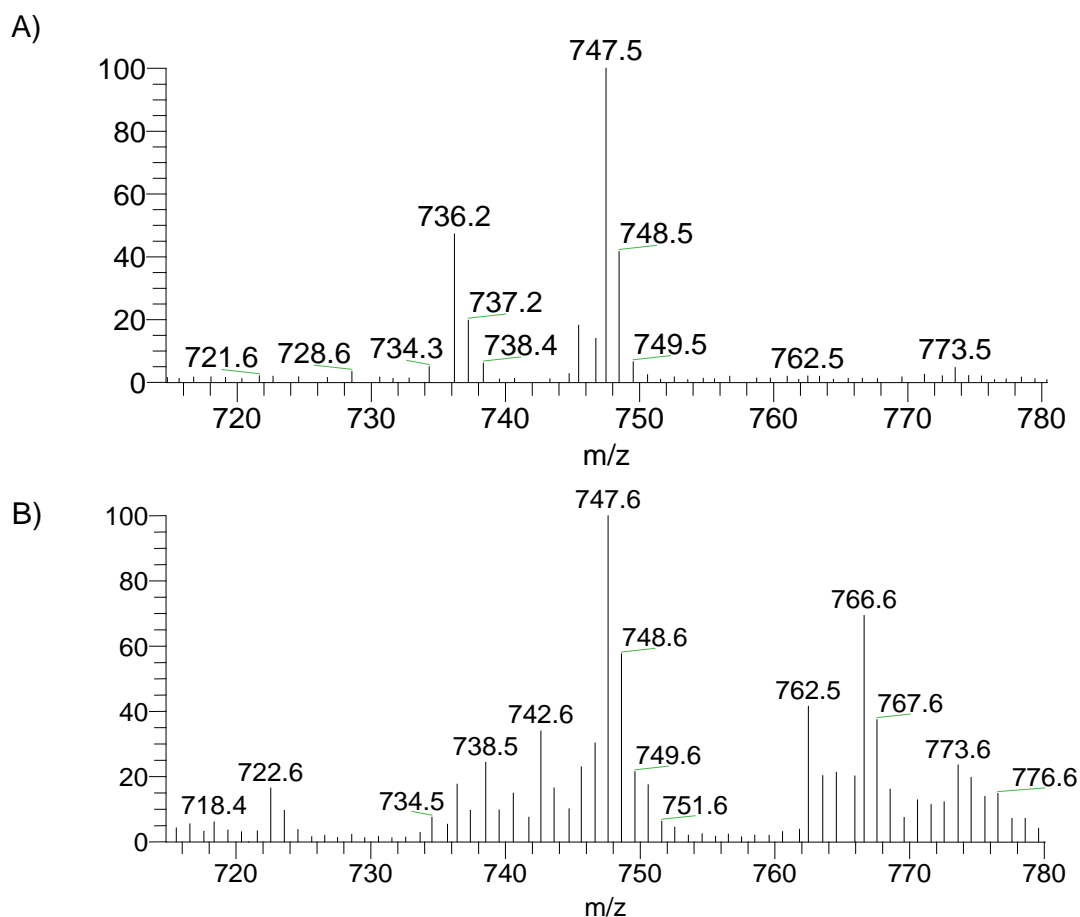


Figura 20 – Espectros ESI-MS modo negativo de extratos de PG separadas por TLC, de mitocôndrias de A) ratos controlo e de B) ratos diabéticos.

Em ambos os espectros, o ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 747, correspondente à PG (C16:0/C18:1) foi o que apresentou uma maior abundância. No espectro de MS da situação controlo verificou-se a presença de um ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 736, não pertencente à classe das PG que poderia ter resultado da co-eluição de uma outra classe fosfolipídica (nomeadamente as PE's) com a classe das PG's aquando da separação por TLC. Da análise comparativa dos espectros obtidos para os diferentes grupos experimentais foi possível observar algumas diferenças em relação à abundância de espécies moleculares de PG's. De um modo geral, em relação à espécie molecular $[M-H]^-$ com valor de m/z 747 (C16:0/C18:1) verificou-se um aumento da abundância relativa dos iões correspondentes às espécies moleculares de PG's nos animais diabéticos. Nomeadamente, as espécies $[M-H]^-$ com valor de m/z 743 (C16:1/C18:2 ou C16:2/C18:1), m/z 773 (C18:2/C18:0 ou C16:0/C20:2) e m/z 775 (C18:1/C18:0 ou C16:0/C20:1).

Posteriormente realizou-se MS/MS dos iões mais abundantes observados nos espectros de MS das diferentes condições experimentais. Através da interpretação direta dos espectros de MS/MS adquiridos e da fragmentação característica desta classe (**Figura 21**) foi possível identificar as espécies moleculares correspondentes às PG's. Nos espectros de MS/MS foram possíveis identificar os iões produto correspondentes à perda das espécies acil ($[M-H-R_1COOH]^-$ e $[M-H-R_2COOH]^-$) e às espécies acil ($[R_1COO]^- < [R_2COO]^-$). Na fragmentação das PG's, apesar de não ser visível na **Figura 21**, também se formam iões correspondentes à cabeça polar (m/z 171) e da cabeça polar combinada com a perda de uma molécula de água (m/z 153) [84].

Na **Tabela 5** registaram-se os valores das espécies moleculares de PG analisadas por MS/MS e pela fragmentação desta classe, assim como a respetiva composição em ácidos gordos. Analisando as espécies moleculares de PG's identificadas verificou-se que a maioria das espécies acil presentes são o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2).

Tabela 5 – Glicerofosfatidilgliceróis identificados e analisados por ESI-MS e por ESI-MS/MS no modo negativo de mitocôndrias de ratos controlo e de ratos diabéticos.

<i>[M-H]⁻ m/z</i>	<i>C:N</i>	<i>Composição em Ácidos Gordos</i>
<i>Espécies Diacil</i>		
719	32:1	16:0/16:1
721	32:0	16:0/16:0
743	34:3	16:1/18:2 16:2/18:1
745	34:2	16:0/18:2 16:1/18:1
747	34:1	16:0/18:1
769	36:4	16:0/20:4 16:1/20:3 18:2/18:2
771	36:3	18:1/18:2
773	36:2	18:2/18:0 16:0/20:2
775	36:1	18:1/18:0 16:0/20:1

Na análise por MS/MS só se verificou a presença de espécies acil polinsaturadas numa espécie molecular de PG, o ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 769. No entanto, avaliando os espectros da **Figura 20** verificou-se que este ião não era abundante nem no grupo controlo nem no grupo dos animais diabéticos.

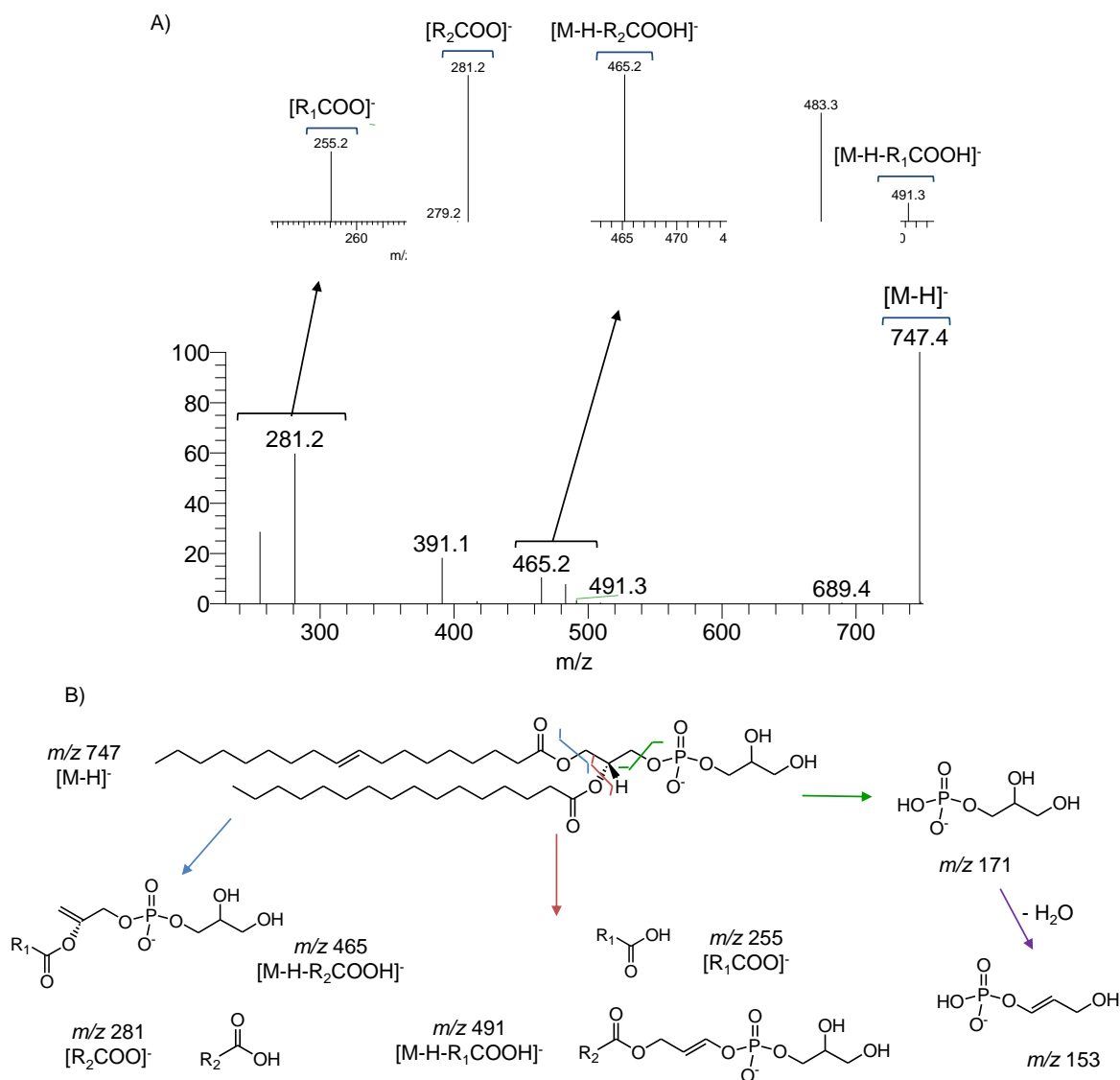


Figura 21 – A) Espectro de MS/MS do ião $[M-H]^-$ com m/z 747 correspondente à PG C18:1/C16:0 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 747 com formação dos iões produto $[M-H-R_1COOH]^-$, $[R_1COO]^-$, $[M-H-R_2COOH]^-$ e $[R_2COO]^-$.

Terminada a análise das espécies moleculares de PG realizou-se o mesmo tipo de análise para as espécies moleculares da classe fosfolipídica glicerofosfatidilinositol.

3.2.1.3. Glicerofosfatidilinositol

Os espectros de MS dos glicerofosfatidilinositóis extraídos dos *spots* obtidos do TLC foram adquiridos no modo negativo (**Figura 22**), encontrando-se representados na **Figura 22A** os espectros de MS adquiridos para o grupo controlo e na **Figura 22B** os espectros de MS adquiridos para o grupo de animais diabéticos.

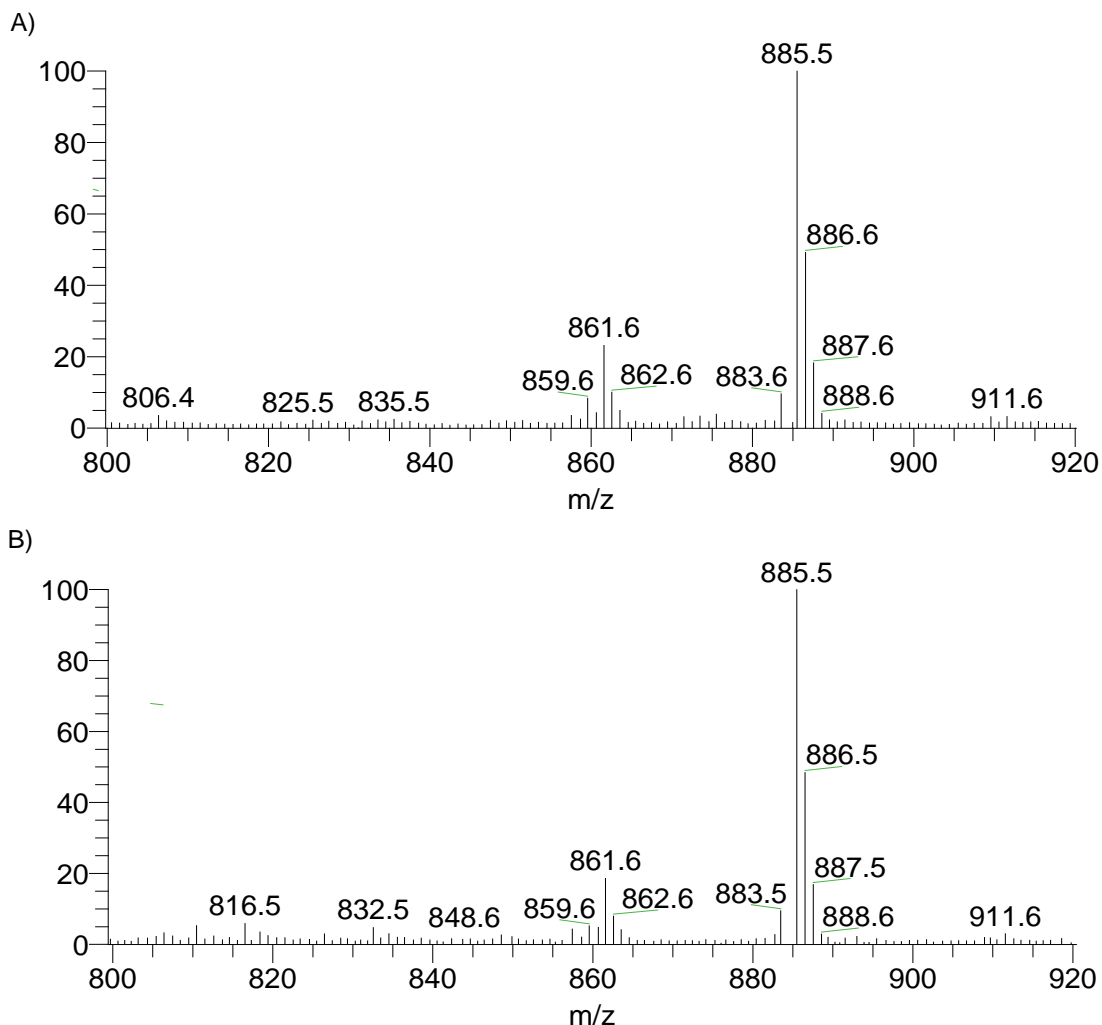


Figura 22 – Espectros ESI-MS modo negativo de extratos de PI separadas por TLC, de mitocôndrias de A) ratos controlo e de B) ratos diabéticos.

Em ambos os espectros, o ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 885, correspondente à PI (C18:0/C20:4), foi o mais abundante não se tendo observado diferenças entre os grupos experimentais estudados. De um modo geral, em comparação com o ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 885 (C18:0/C20:4) verificou-se uma ligeira diminuição da abundância relativa do ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 861, correspondente à PI (C18:0/C18:2), nos animais diabéticos relativamente aos controlo. Por sua vez, o ião $[M-H]^-$ com valor de m/z 991, correspondente à PI (C18:0/C22:5), em relação à espécie molecular $[M-H]^-$ com valor de m/z 885 (C18:0/C20:4) manteve-se aproximadamente igual entre os grupos experimentais. Tendo em consideração a baixa abundância das espécies moleculares $[M-H]^-$ com valor de m/z 825 e m/z 835, estas não foram analisadas por MS/MS.

Posteriormente realizou-se MS/MS dos íões mais abundantes observados nos espectros de MS das duas diferentes condições experimentais. Através da interpretação direta dos espectros de MS/MS adquiridos e da fragmentação característica desta classe (**Figura 23**) foi possível identificar as espécies moleculares correspondentes aos PI's. Nos espectros de MS/MS correspondentes às PI's (**Figura 23**) pode-se observar os íões produto $[M-H-162-R_1COOH]^-$ e $[M-H-162-R_2COOH]^-$ e os íões produto correspondentes à perda das espécies acil ($[M-H-R_1COOH]^-$ e $[M-H-R_2COOH]^-$) e às espécies acil ($[R_1COO]^- < [R_2COO]^-$). Apesar de não ser visível na **Figura 23A**, na fragmentação das PI's também se formam íões correspondentes ao íão fosfato-inositol (m/z 241), que são característicos dos lípidos que contenham inositol na sua estrutura [84, 85].

Na **Tabela 6** registaram-se os valores das espécies moleculares de PI analisadas por MS/MS e pela fragmentação desta classe, assim como a respetiva composição em ácidos gordos. Da análise das espécies moleculares de PI's identificadas verificou-se que a maioria das espécies acil presentes são o ácido palmítico (C16:0), o ácido palmitoleico (C16:1), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2). No entanto, também se verificou a presença de cadeias acil polinsaturadas, como é o caso do ácido araquidónico (C20:4), do ácido docosapentaenóico (C22:5) e do ácido docosahexaenóico (C22:6). A presença destas espécies acil polinsaturadas com elevado número de átomos de carbono foi verificada nos íões $[M-H]^-$ com valor de m/z 857 (C16:0/C20:4), m/z 883 (C18:1/C20:4), m/z 885 (C18:0/C20:4), m/z 909 (C18:0/C22:6) e m/z 911 (C18:0/C22:5). Com a exceção do íão $[M-H]^-$ com valor de m/z 885 (C18:0/C20:4) presente em maior abundância, todos os íões apresentavam uma abundância baixa e como tal estiveram menos suscetíveis à oxidação [81].

Tabela 6 – Glicerofosfatidilinositóis identificados e analisados por ESI-MS e por ESI-MS/MS no modo negativo de mitocôndrias de ratos controlo e de ratos diabéticos.

<i>[M-H]⁻ m/z</i>	<i>C:N</i>	<i>Composição em Ácidos Gordos</i>
<i>Espécies Diacil</i>		
833	34:2	16:0/18:2
857	36:4	16:0/20:4
859	36:3	18:1/18:2
861	36:2	18:0/18:2

863	36:1	18:0/18:1
883	38:5	18:1/20:4
885	38:4	18:0/20:4
887	38:3	18:1/20:2
		18:0/20:3
909	40:6	18:0/22:6
911	40:5	18:0/22:5

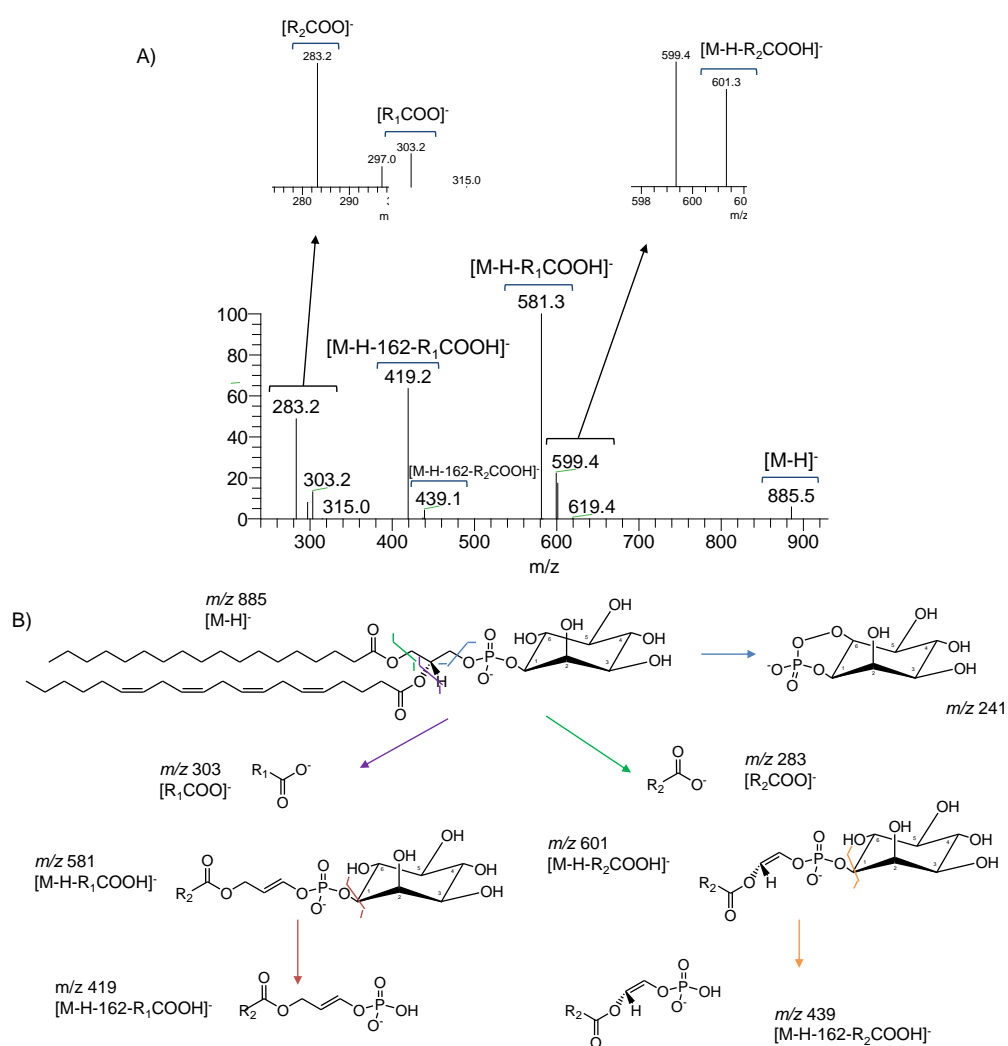


Figura 23 – A) Espectro de MS/MS do íon $[M-H]^-$ com m/z 885 correspondente ao PI C18:1/C16:0 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íon $[M-H]^-$ com valor de m/z 885 com formação dos íões produto $[M-H-R_1COOH]^-$, $[R_1COO]^-$, $[M-H-R_2COOH]^-$, $[R_2COO]^-$, $[M-H-162-R_1COOH]^-$ e $[M-H-162-R_2COOH]^-$.

No capítulo que se segue irá ser abordada a análise de fosfolípidos por MS no modo positivo com o objetivo de identificar as espécies moleculares de glicerofosfatidilcolina, glicerofosfatidiletanolamina e de esfingomielinas presentes nas mitocôndrias de tecido cardíaco.

3.2.2. Análise de Espectros de MS no Modo Positivo

3.2.2.1. Glicerofosfatidilcolina

Da análise da **Figura 17** verifica-se que a classe da PC é a classe de fosfolípidos que se encontra em maior abundância na mitocôndria.

Os espectros de MS das glicerofosfatidilcolinas extraídas dos *spots* obtidos do TLC foram adquiridos no modo positivo (**Figura 24**), encontrando-se representados na **Figura 24A** os espectros de MS adquiridos para o grupo controlo e na **Figura 24B** os espectros de MS adquiridos para a diabetes, grupo DMT1.

De modo a identificar as espécies moleculares $[M+H]^+$ das PC's, recorrendo a um triplo quadrupólo, realizou-se um *parent scan* do ião m/z 184 do extrato do *spot* correspondente às PC's obtido do TLC. A formação do ião produto de m/z 184 correspondente à fosfocolina ($H_2PO_4 (CH_2)_2N^+(CH_3)_3$) é característica das classes lípicas que possuem na estrutura fosfocolina [85].

As diferenças que foram observadas nos espectros de MS no modo positivo das duas condições experimentais foram notórias. No espectro de MS da **Figura 24A** verificou-se que o ião mais abundante foi o ião $[MH]^+$ com valor de m/z 786 (C18:1/C18:2). Verificou-se também que os iões $[MH]^+$ com valor de m/z 758 (C16:0/C18:2), m/z 782 (C16:0/C20:4; C18:2/C18:2) e m/z 810 (C18:0/C20:4) apresentavam uma abundância considerável, mas inferior à do ião $[MH]^+$ com valor de m/z 786. Por sua vez, no espectro de MS do grupo DMT1, apresentado na **Figura 24B** verificou-se que o ião mais abundante já não corresponde ao ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 786 mas sim ao ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 810 (C18:0/C20:4). Observa-se ainda neste espectro a presença de outros três iões com uma abundância relativa elevada, nomeadamente os iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 758 (C16:0/C18:2), m/z 782 (C16:0/C20:4; C18:2/C18:2) e m/z 786 (C18:1/C18:2).

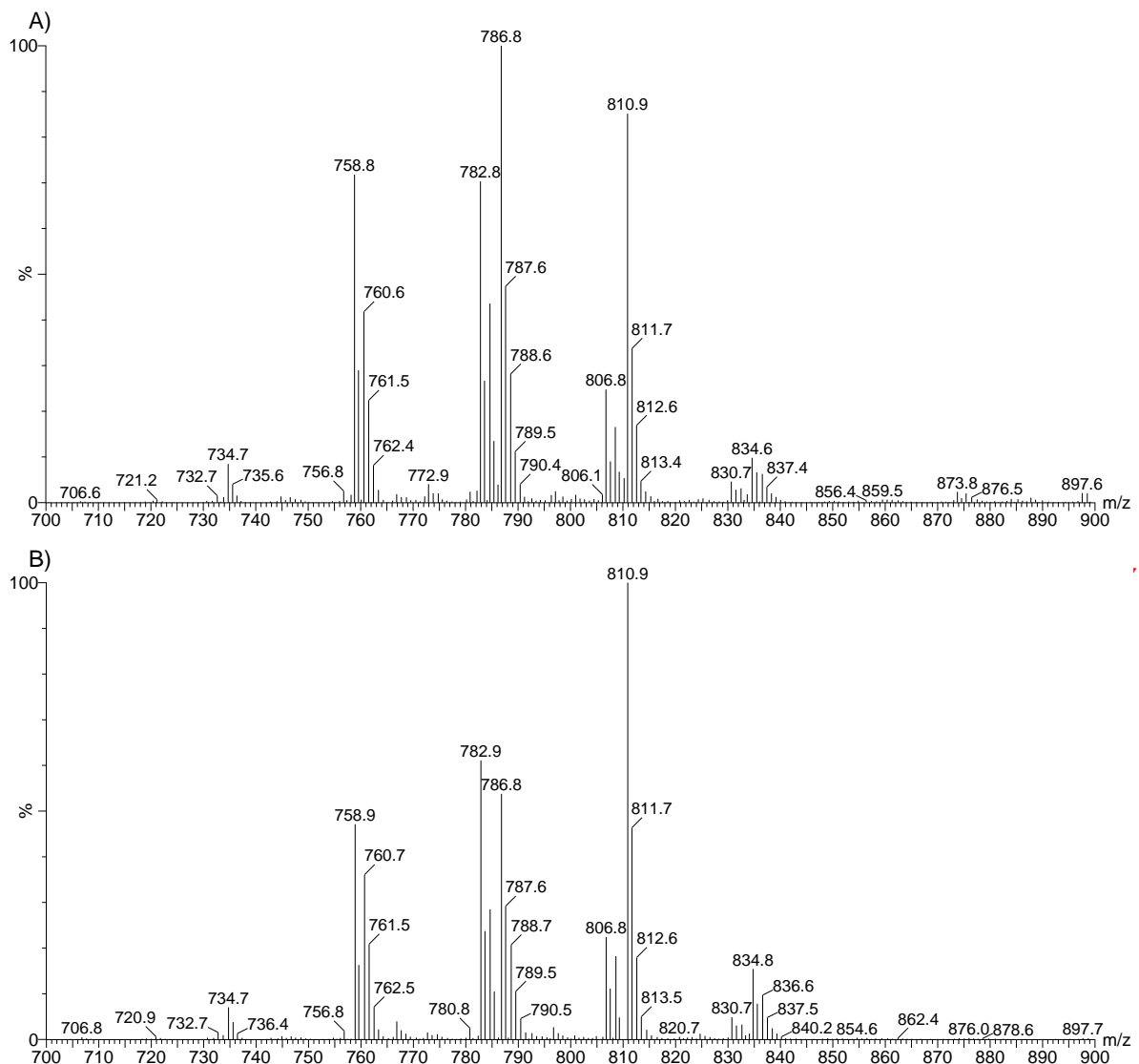


Figura 24 – Espectros ESI-QqQ MS modo positivo de extratos de PC de mitocôndrias de A) ratos controle e de B) ratos diabéticos, separadas por TLC.

Assim sendo, em ambos os espectros verificou-se que as espécies moleculares de PC's com valor de m/z 758 (C16:0/C18:2) e m/z 782 (C16:0/C20:4; C18:2/C18:2) mantiveram-se abundantes nas mitocôndrias em ambas as condições experimentais. Verificou-se também que as espécies moleculares abundantes na mitocôndria nos animais controle não são as mesmas nos animais diabéticos. No entanto, verificou-se que em ambos os espectros alguns iões $[M+H]^+$ apresentaram uma abundância pequena, nomeadamente os iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 734, m/z 788, m/z 806, m/z 808, m/z 812 e m/z 834, correspondentes às PC's (C16:0/C16:0), (C18:0/C18:1), (C18:2/C20:4), (C16:0/C22:5; C18:0/C20:5), (C16:2/C22:1) e (C16:0/C24:6; C18:0/C22:6; C18:1/C22:5; C20:1/C20:5), respetivamente.

Posteriormente, as espécies moleculares identificadas foram analisadas por MS/MS no modo positivo com o objetivo de identificar as espécies acil presentes na estrutura de cada um dos íões identificados como sendo PC.

Na estrutura das PC's, devido à presença de uma amina quaternária com carga positiva, o grupo fosfato pode ser neutralizado pela adição de uma espécie com carga positiva, como por exemplo de um próton. Na fragmentação das PC's protonadas (**Figura 25B**) verificou-se a formação dos íões produto correspondentes à perda dos grupos acil ($[M+H-R_1COOH]^+$ e $[M+H-R_2COOH]^+$) e do íão m/z 184 correspondente à fosfocolina [84, 85].

Na **Tabela 7** encontram-se registados os valores das espécies moleculares de PC analisadas por MS/MS e pela fragmentação desta classe, assim como a respetiva composição em ácidos gordos.

Tabela 7 – Glicerofosfatidilcolinas identificadas no modo positivo por varrimento de *parent ion* de m/z de 184, de mitocôndrias de ratos controlo e diabéticos, com posterior identificação dos ácidos gordos por ESI-MS/MS no modo positivo.

$[M+H]^+ m/z$	C:N	Composição em Ácidos Gordos
Espécies Diacil		
734	32:0	16:0/16:0
756	34:3	16:0/18:3
758	34:2	16:0/18:2
760	34:1	16:0/18:1
762	34:0	16:0/18:0
782	36:4	16:0/20:4
		18:2/18:2
784	36:3	16:0/20:3
786	36:2	18:1/18:1
788	36:1	18:0/18:1
806	38:6	18:2/20:4
808	38:5	16:0/22:5

		18:0/20:5
810	38:4	18:0/20:4
812	38:3	16:2/22:1
834	40:6	16:0/24:6
		18:0/22:6
		18:1/22:5
		20:1/20:5

Após análise dos dados obtidos na identificação das espécies moleculares de PC's identificadas verificou-se que os ácidos gordos mais abundantes nesta classe são o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2). No entanto, também se verificou a presença de cadeias acil polinsaturadas, como é o caso do ácido araquidónico (C20:4), do ácido docosapentaenóico (C22:5) e do ácido docosahexaenóico (C22:6). A presença destas espécies acil polinsaturadas com elevado número de átomos de carbono foi verificada nos iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 782 (C16:0/**C20:4**; C18:2/C18:2), m/z 806 (C18:2/**C20:4**), m/z 808 (C18:0/**C20:5**, C16:0/**C22:5**), m/z 810 (C18:0/**C20:4**) e m/z 834 (C16:0/**C24:6**; C18:0/**C22:6**; C18:1/**C22:5**; C20:1/**C20:5**). Nas mitocôndrias dos animais diabéticos, com a exceção dos iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 810 e m/z 782, todos os iões referidos apresentaram uma abundância baixa e como tal estiveram menos suscetíveis à oxidação [81].

No presente estudo verificou-se que no caso da classe das PC's, em ambas as condições experimentais, não foram observadas espécies moleculares correspondentes a formas oxidadas. Esta observação sugere que, apesar da presença de cadeias acil polinsaturadas com elevado número de átomos de carbono, as espécies moleculares de PC são menos suscetíveis à oxidação. Esta observação está de acordo com as que foram feitas por Bayir e colaboradores. Neste estudo, Bayir e colaboradores verificaram que, 24 horas após uma lesão cerebral traumática, as classes fosfolipídicas mais abundantes na mitocôndria (nomeadamente PC e PE) estão menos suscetíveis à oxidação [81].

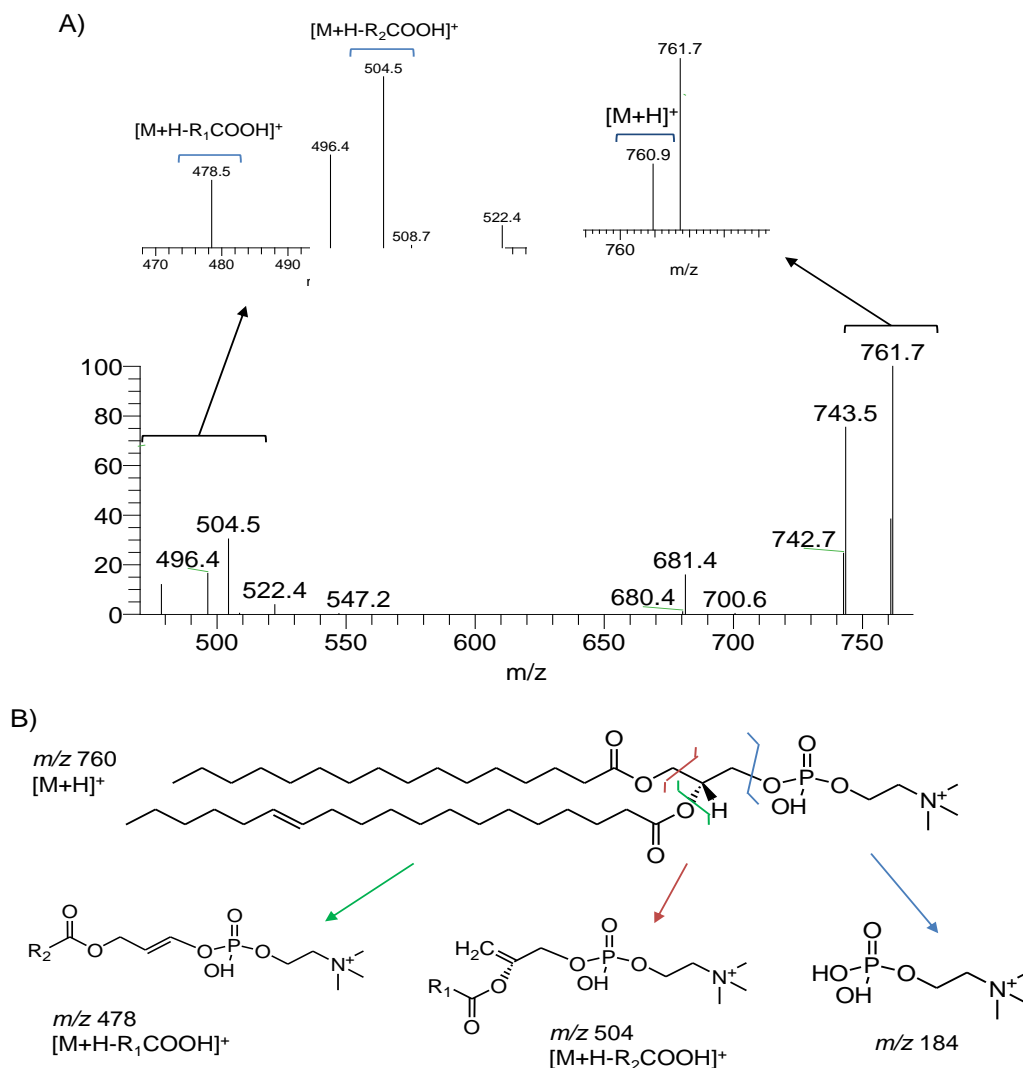


Figura 25 – A) Espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$ com m/z 760 correspondente à PC C16:0/C18:1 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íon $[M+H]^+$ com valor de m/z 760, com formação dos íões produto $[M+H-R_1COOH]^+$, $[M+H-R_2COOH]^+$ e do íon m/z 184 correspondente à fosfocolina.

Na separação das várias classes do extrato lipídico mitocondrial verificou-se a separação de uma classe correspondente à lisofosfatidilcolina (**Figura 16**). A percentagem relativa desta classe no extrato lipídico mitocondrial (**Figura 17**) também foi determinada. No entanto, devido à sua baixa abundância não foi possível analisá-la por MS nem MS/MS e portanto identificar as espécies moleculares desta classe presentes nas mitocôndrias.

Após a análise das glicerofosfatidilcolinas por MS no modo positivo, também se analisou do mesmo modo as glicerofosfatidiletanolaminas (também em elevada

percentagem na mitocôndria) e as esfingomielinas, que se verificaram ser menos abundantes na mitocôndria.

3.2.2.2. Glicerofosfatidiletanolamina

A classe das glicerofosfatidiletanolaminas (PE) constitui uma das classes mais abundantes nas membranas celulares. Esta classe caracteriza-se pela presença na sua cabeça da etanolamina ($\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{OH}$), contendo assim na sua estrutura uma amina primária (**Figura 3C**). Ao observa-se a **Figura 17** verifica-se que, assim como a CL e a PC, a classe da PE também se encontra na mitocôndria em maior abundância.

Os espectros de MS das glicerofosfatidiletanolaminas extraídas dos *spots* obtidos do TLC foram adquiridos no modo positivo (**Figura 26**), encontrando-se representados na **Figura 26A** os espectros de MS adquiridos para o grupo controlo e na **Figura 26B** os espectros de MS adquiridos para a diabetes, grupo DMT1.

De modo a identificar as espécies moleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ das PE's, recorreu-se a um triplo quadrupólo, realizando-se o *neutral loss* do ião m/z 141 do extrato do *spot* correspondente às PE's obtido do TLC. A perda da espécie molecular neutra da fosfoetanolamina ($\text{HPO}_4^-(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{H}_3$) é característica desta classe lipídica [84, 85]. Posteriormente, cada espécie molecular identificada em MS foi analisada por MS/MS no modo positivo com o objetivo de identificar as espécies acil e/ou alquilacil presentes na estrutura de cada um dos iões identificados como sendo PE. Nos espectros de MS no modo positivo PE's das duas condições experimentais verificaram-se algumas diferenças. No espectro de MS da **Figura 26A** verificou-se que o ião mais abundante foi o ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ com valor de m/z 768 (C18:0/C20:4). Verificou-se também que os iões $[\text{M}+\text{H}]^+$ com valor de m/z 744 (C18:0/C18:2), m/z 764 (C16:0/C22:6; C18:2/C20:4) e m/z 792 (C18:0/C22:6) apresentavam uma abundância considerável, mas inferior à do ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ com valor de m/z 768. Por sua vez, no espectro de MS da **Figura 26B** verificou-se que o ião mais abundante já não se tratava do ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ com valor de m/z 768 mas sim do ião $[\text{M}+\text{H}]^+$ com valor de m/z 792 (C18:0/C22:6). Relativamente a este ião verificou-se que neste espectro estavam presentes outros iões com uma abundância elevada. Nomeadamente os iões $[\text{M}+\text{H}]^+$ com valor de m/z 744 (C18:0/C18:2), m/z 764 (C16:0/C22:6; C18:2/C20:4) e m/z 768 (C18:0/C20:4). Mesmo assim, verificou-se em ambos os espectros que as espécies moleculares de PE's com valor de m/z 744 (C18:0/C18:2) e m/z 764 (C16:0/C22:6; C18:2/C20:4) mantiveram-se abundantes nas mitocôndrias em ambas as condições experimentais. No entanto, verificou-se que em ambos os espectros alguns

iões $[M+H]^+$ apresentaram uma abundância pequena, nomeadamente os iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 716 (C16:0/C18:2), m/z 718 (C16:0/C18:1), m/z 740 (C16:0/C20:4; C18:2/C18:2), m/z 746 (C18:0/C18:1), m/z 766 (C16:0/C22:5), m/z 770 (C18:0/C20:3), m/z 778 (O-C18:0/C22:6; O-C20:2/C20:4; O-C22:6/C18:0), m/z 788 (C18:2/C22:6) e m/z 790 (C18:1/C22:6).

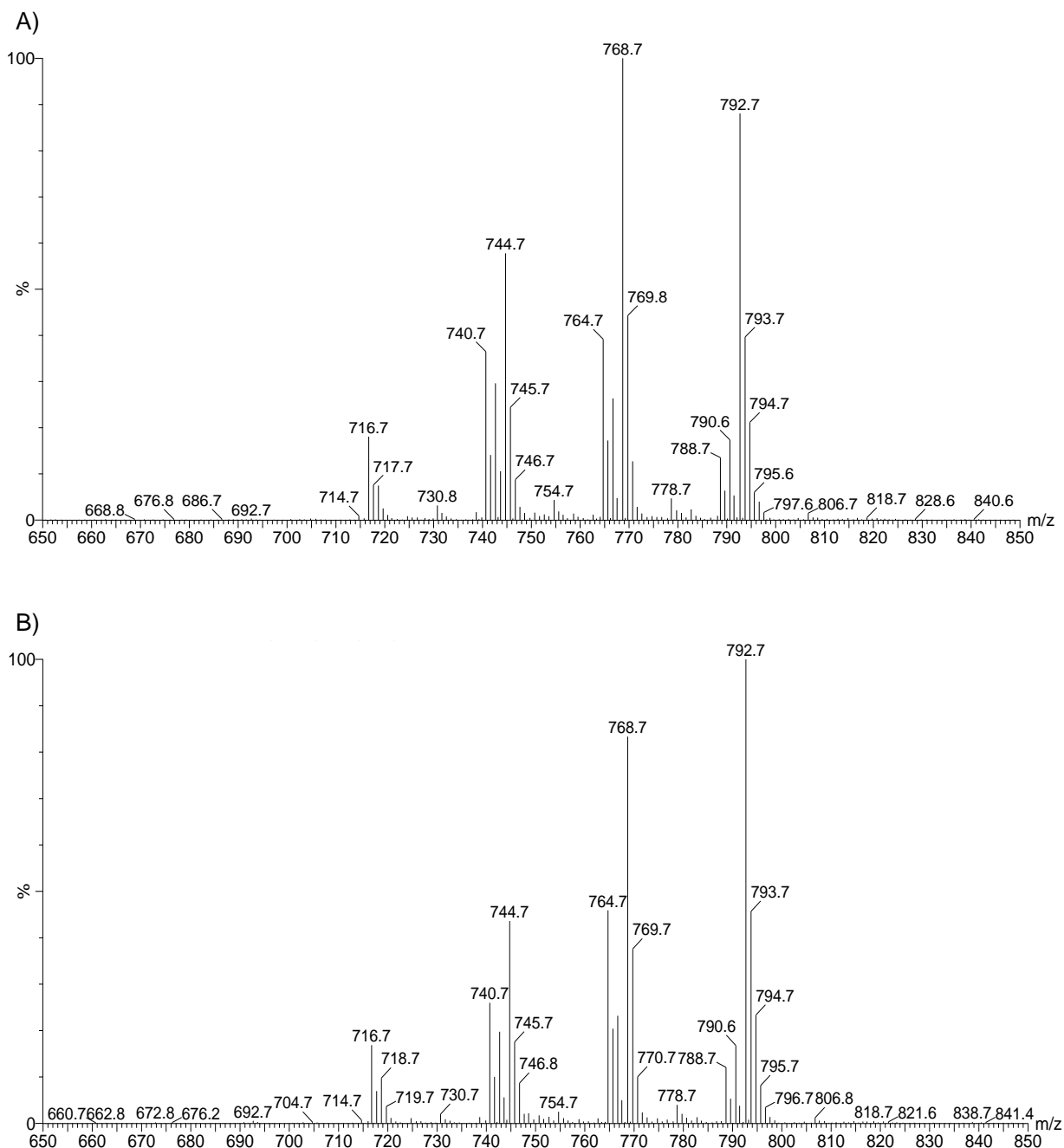


Figura 26 – Espectros ESI-QqQ MS modo positivo do extrato de PE de mitocôndrias de A) ratos controlo e de B) ratos diabéticos, separadas por TLC.

Nos espectros de MS/MS dos iões $[M+H]^+$ das PE's (**Figura 27B**) pode-se observar os iões produto formados por perda da fosfoetanolamina ($[M+H-141]^+$).

Na **Tabela 8** encontram-se registados os valores das espécies moleculares de PE analisadas por MS/MS e pela fragmentação desta classe, assim como a respetiva composição em ácidos gordos.

Tabela 8 – Glicerofosfatidiletanolaminas identificadas no modo positivo por varrimento de *neutral loss* de 141, de mitocôndrias de ratos controlo e de ratos diabéticos, com posterior identificação dos ácidos gordos por ESI-MS/MS no modo negativo.

$[M+H]^+$ m/z	C:N	Composição em Ácidos Gordos	$[M+H]^+$ m/z	C:N	Composição em Ácidos Gordos
Espécies Diacil			Espécies Alquilacil		
716	34:2	16:0/18:2			
718	34:1	16:0/18:1			
740	36:4	16:0/20:4 18:2/18:2	730	36:2	O-18:0/18:2
742	36:3	18:1/18:2			
744	36:2	18:0/18:2			
746	36:1	18:0/18:1	752	38:5	O-18:1/20:4
			754	38:4	O-18:0/20:4
764	38:6	16:0/22:6 18:2/20:4			
766	38:5	16:0/22:5 18:1/20:4			
768	38:4	18:0/20:4			
770	38:3	18:0/20:3			

			776	40:7	O-18:1/22:6
			778	40:6	O-18:0/22:6
					O-20:2/20:4
					O-22:6/18:0
788	40:8	18:2/22:6			
790	40:7	18:1/22:6			
792	40:6	18:0/22:6			
794	40:5	18:0/22:5			
796	40:4	18:0/22:4			
			808	42:5	O-20:0/22:5

Durante a análise dos espectros de MS/MS de cada um dos iões identificados por “*neutral loss*” de 141 como sendo PE’s detetaram-se espécies alquilacil e diacil de PE’s. Nesta classe fosfolipídica, a presença de espécies alquenilacil na estrutura do fosfolípido normalmente é mais frequente do que a de espécies alquilacil. No entanto, a análise dos espectros de MS/MS adquiridos apresenta a limitação de não ser possível distinguir se se trata de uma cadeia alquenilacil com a mesma massa molecular que uma cadeia alquilacil com mais uma ligação dupla [88]. Por este motivo, as espécies moleculares de PE’s representadas na Tabela 8 foram consideradas como sendo todas constituídas por cadeias alquilacil. Foi possível diferenciar as espécies alquil uma vez estas se caracterizam por uma diferença de massa de 14 Da relativamente à espécie acil correspondente, devido ao tipo de ligação com o glicerol. Ou seja, a ligação das espécies alquil ao glicerol é feita por uma ligação éter vinil (R-O-CH=CH-R’) enquanto as espécies acil formam uma ligação éster (R-COO-R’) [88]. Por exemplo, os iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 778 (**O-18:0/22:6**) tem na composição do ácido gordo C18:0 uma diferença de massa de 14 Da relativamente ao ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 792 (**18:0/22:6**).

Após a identificação, da interpretação das espécies moleculares de PE’s identificadas foi possível verificar que, assim como nas PC’s, o ácido palmítico (C16:0), o ácido esteárico (C18:0), o ácido oleico (C18:1) e o ácido linoleico (C18:2) se encontravam presentes numa grande variedade de espécies de PE’s. No entanto, também se verificou a presença de algumas espécies com cadeias acil polinsaturadas, como é o caso do

ácido araquidônico (C20:4), do ácido docosapentaenóico (C22:5) e do ácido docosahexaenóico (C22:6). No entanto, assim como no caso das PC's, também se verificou que em ambas as condições experimentais, na classe das PE's não foram observadas espécies moleculares correspondentes a formas oxidadas. Esta observação sugere que, apesar da presença de cadeias acil polinsaturadas com elevado número de átomos de carbono, as espécies moleculares de PE são menos suscetíveis à oxidação. Esta observação encontra-se de acordo com as que foram feitas por Bayir e colaboradores para as classes mitocondriais mais abundantes em tecido cerebral, 24 horas após uma lesão cerebral traumática [81].

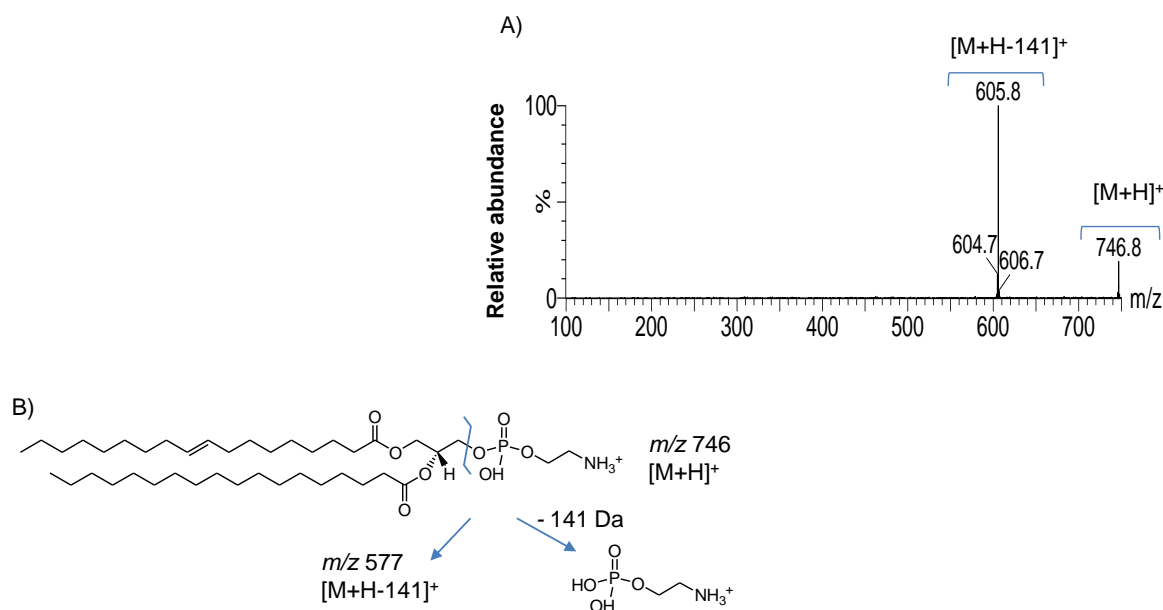


Figura 27 – A) Espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$ com m/z 746 correspondente à PE C18:0/C18:1 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas no íon $[M+H]^+$ com valor de m/z 746 com formação do íon produto $[M+H-141]^+$, correspondente à perda da cabeça polar na forma de fosfoetanolamina (m/z 141).

3.2.2.3. Esfingomielina

A esfingomielina (SM), assim como a glicerofosfatidilcolina, caracteriza-se pela presença de uma amina quaternária cuja carga positiva é neutralizada pela carga negativa do grupo fosfato.

Ao observa-se a **Figura 17** verificou-se que a classe da SM é uma classe que se encontra na mitocôndria em menor abundância.

Os espectros de MS das esfingomielinas extraídas dos *spots* obtidos do TLC foram adquiridos no modo positivo (**Figura 26**), encontrando-se representados na **Figura 26A** os espectros de MS adquiridos para a situação controlo e na **Figura 26B** os espectros de MS adquiridos para a situação de diabetes. De modo a identificar as espécies moleculares $[M+H]^+$ das SM's, recorreu-se a um triplo quadrupólo, realizando-se deste modo um *parent scan* do ião m/z 184 do extrato do *spot* correspondente às SM's obtido do TLC. A perda do ião correspondente à fosfocolina ($H_2PO_4(CH_2)_2N^+(CH_3)_3$) é característica das classes lípicas que a possuem na sua estrutura [85, 86], o que permitiu a realização do *parent scan*. Posteriormente, as classes identificadas foram analisadas por MS/MS no modo positivo com o objetivo de identificar os grupos acil presentes na estrutura de cada um dos iões identificados como sendo SM.

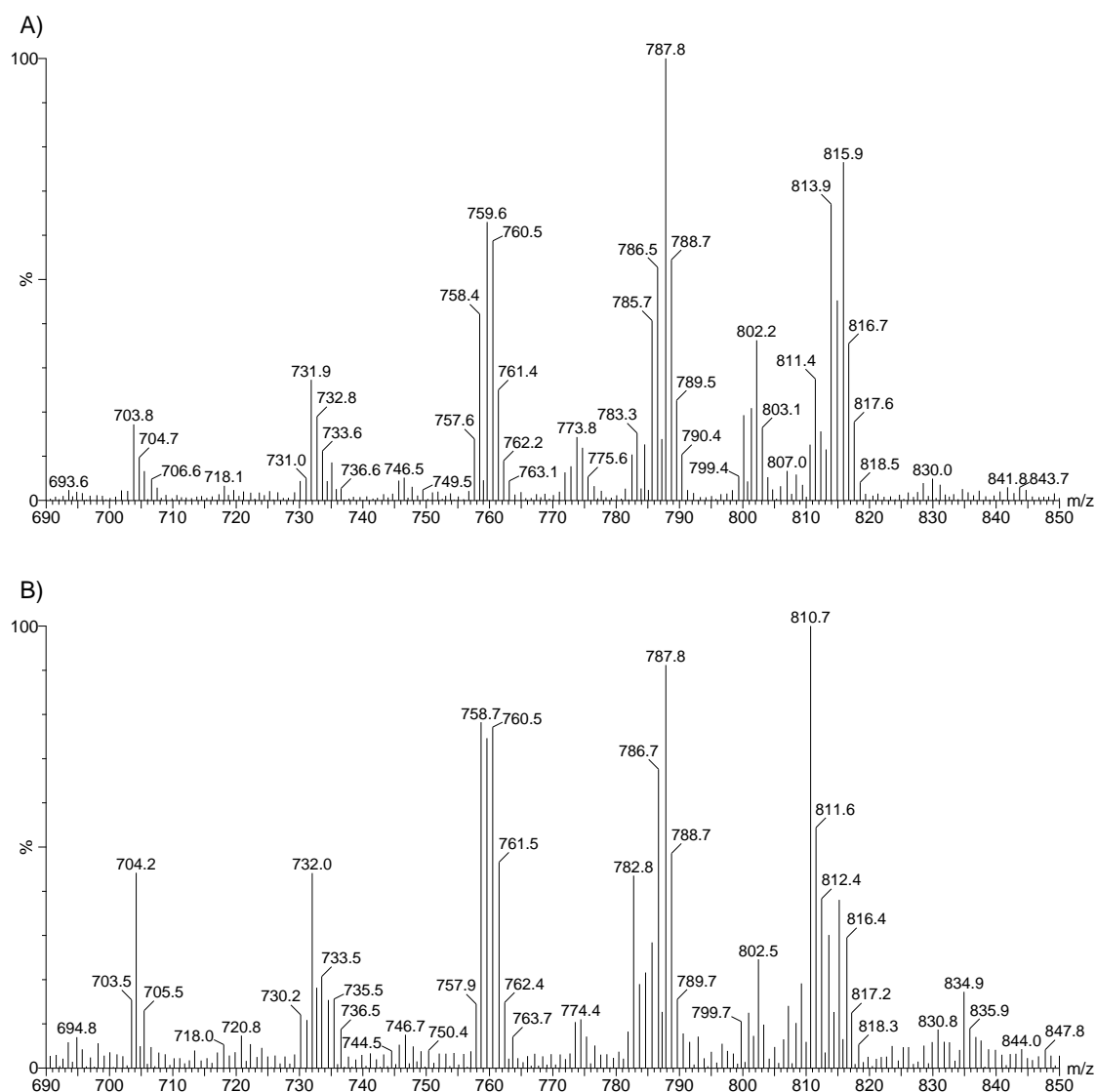


Figura 28 – Espectros ESI-QqQ MS modo positivo de extratos de SM de mitocôndrias de A) ratos controlo e de B) ratos diabéticos, separadas por TLC.

No espectro de MS da **Figura 28A** verificou-se que o ião mais abundante foi o ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 787 (dC18:0/C20:1). Nestes espectros observou-se ainda o ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 817 (dC18:0/C24:0), mas com menor abundância relativa. As diferenças que foram observadas nos espectros de MS no modo positivo das duas condições experimentais foram notórias. No entanto, verificou-se que em ambos os espectros alguns iões $[M+H]^+$ apresentaram uma abundância pequena, nomeadamente os iões $[M+H]^+$ com valor de m/z 705 (dC18:0/C16:0), m/z 733 (dC18:0/C18:0), m/z 789 (dC18:0/C22:0) e m/z 817 (dC18:0/C24:0). Por sua vez, no espectro de MS da **Figura 28B** verificou-se que o ião mais abundante continuava a ser o ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 787 (dC18:0/C20:1). Relativamente ao ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 787, também se verificou neste espectro que o ião $[M+H]^+$ com valor de m/z 817 (dC18:0/C24:0) apresentou um ligeiro aumento da sua abundância comparativamente ao espectro da situação controlo. Assim sendo, em ambos os espectros verificou-se que a espécie molecular de SM's com valor de m/z 787 (dC18:0/C20:1) manteve-se abundante nas mitocôndrias em ambas as condições experimentais. Na **Figura 29A** encontra-se representado o espectro de MS/MS no modo positivo obtido para as SM's protonadas. Na fragmentação característica das SM's protonadas (**Figura 29B**) observa-se a formação do ião produto m/z 184 correspondente à da fosfocolina [85, 86].

Na **Tabela 9** encontram-se registados os valores das espécies moleculares de SM analisadas por MS/MS e pela fragmentação desta classe, assim como a respetiva composição em ácidos gordos.

Tabela 9 – Esfingomielinas identificadas no modo positivo por varrimento de *parent ion* de m/z 184, de mitocôndrias de ratos diabéticos e não diabéticos, com posterior identificação dos ácidos gordos por ESI-MS/MS no modo positivo.

$[M+H]^+ m/z$	C:N	Composição em Ácidos Gordos
<i>Espécies Diacil</i>		
705	34:0	d18:0/16:0
733	36:0	d18:0/18:0
787	40:1	d18:1/22:0
789	40:0	d18:0/22:0
815	42:1	d18:1/24:0

817	42:0	d18:0/24:0
------------	------	------------

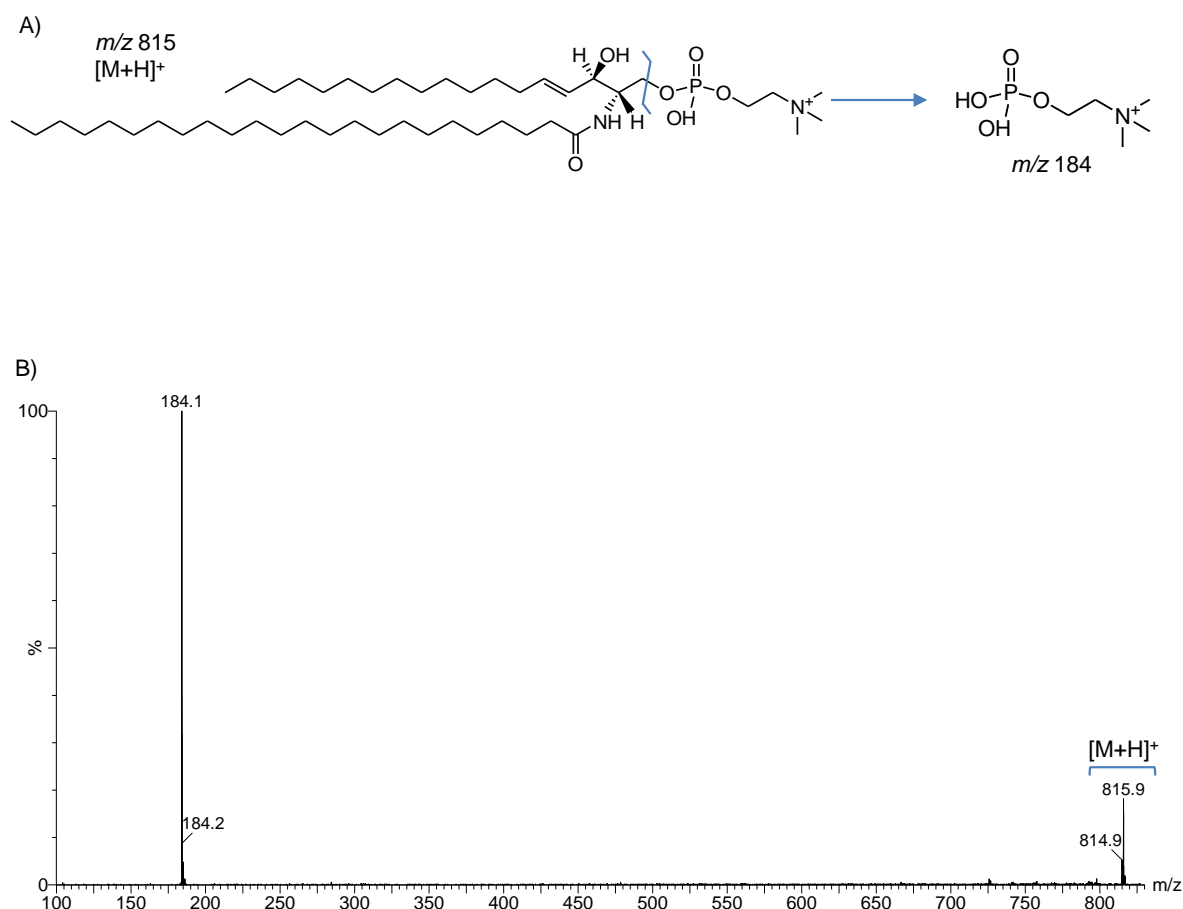


Figura 29 – A) Espectro de MS/MS do íon $[M+H]^+$ com m/z 815 correspondente à SM d18:1/C24:0 presente na mitocôndria de tecido muscular cardíaco. B) Fragmentações características verificadas do íon $[M+H]^+$ com valor de m/z 815 com formação dos íões produto $[M+H-R_2CO-H_2O]^+$ e do íon m/z 184 correspondente à fosfocolina.

A presença destas espécies acil com elevado número de átomos de carbono foi verificada nos íões $[M+H]^+$ com valor de m/z 789 (dC18:0/C22:0), m/z 815 (d18:1/C24:0) e m/z 817 (dC18:0/C24:0). No grupo DMT1, com a exceção do íon $[M+H]^+$ com valor de m/z 815 correspondente à SM (d18:1/C24:0), todos os íões referidos apresentaram uma abundância baixa e como não apresentaram nenhuma ligação dupla na sua cadeia, não foram suscetíveis à oxidação nos grupos acil [80, 81].

CAPITULO IV
DISCUSSÃO

A diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença metabólica que se caracteriza pela deficiente produção de insulina pelas células beta pancreáticas, com consequente diminuição do *uptake* de glucose pelos tecidos dependentes da insulina, como é o caso do tecido muscular cardíaco [1, 2, 4]. De modo a sustentar as suas necessidades metabólicas, as células necessitam, em determinadas condições, de recorrer a outros substratos para obter energia, nomeadamente às proteínas. Assim, com esta alteração metabólica ocorre um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) na mitocôndria que por sua vez poderão induzir uma alteração da estrutura das proteínas e dos lípidos mitocôndrias, conduzindo a uma alteração da funcionalidade mitocondrial. Associada à patogênese da diabetes *mellitus* encontra-se o desenvolvimento de outras doenças, como a cardiomiopatia diabética. A cardiomiopatia diabética ocorre assim como consequência da alteração do substrato metabólico no tecido cardíaco, conduzindo a um aumento do metabolismo de ácidos gordos, a um aumento de ROS e consequentemente à disfunção mitocondrial que compromete o correto funcionamento do órgão [6].

De modo a avaliar as alterações da funcionalidade mitocondrial nas fases iniciais da cardiomiopatia diabética, injetaram-se ratos *Wistar* com uma única dose de streptozotocina, STZ (60 mg/Kg). A STZ tem uma estrutura semelhante à da glucose, sendo por isso transportada preferencialmente pelo GLUT2 para as células β -pancreáticas. Por se tratar de um agente genotóxico conduz à necrose das células β -pancreáticas e portanto à diminuição da produção de insulina, mimetizando a diabetes *mellitus* tipo 1 [3, 87]. A hiperglicemia, e o aumento dos níveis sanguíneos de HbA1c observados nos animais tratados com STZ, demonstraram que a administração deste químico suprimiu a síntese pancreática de insulina, mimetizando a diabetes *mellitus* tipo 1 (Tabela 2). A suportar estes resultados é ainda de salientar a acentuada diminuição do peso corporal e o ligeiro aumento do peso do coração (Tabela 3) dos animais com diabetes (DMT1), de um modo semelhante ao que já descrito por outros autores [70, 88]. Deste modo, o aumento da razão massa coração/massa corporal observada apenas 4 semanas após a administração de STZ surge como consequência da diminuição acentuada do peso corporal [88-90].

Comparativamente ao grupo CONT, no grupo DMT1 não se observou uma alteração significativa da razão mtDNA/massa coração, um indicador grosseiro do teor mitocondrial [91], o que sugere que na fase inicial da patogênese da DMT1 não ocorre alteração da biogénese mitocondrial cardíaca. Outros autores, no entanto, observaram um aumento da biogénese mitocondrial cardíaca associada a um aumento do *stress*

oxidativo em ratinhos diabéticos OVE26 com 4 a 5 meses de idade [92]. Curiosamente, apesar de não se terem observado alterações da biogénese mitocondrial, com base no rácio mtDNA/massa coração observou-se um aumento da atividade da citrato sintase (Figura 12), possivelmente numa tentativa de compensar a diminuição da atividade da fosforilação oxidativa [93, 94]. Efetivamente, apesar de não se terem observado alterações na organização dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (OXPHOS), avaliada por *Blue Native PAGE* (BN-PAGE) (Figura 13A), induzida pela administração de STZ, verificou-se uma diminuição da atividade da mesma. Após a avaliação da atividade *in-gel* verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa da atividade dos complexos IV e V, apenas 4 semanas após a administração de STZ (Figura 13D). Estes resultados estão de acordo com o já descrito sobre a disfunção mitocondrial associada à diabetes em outros tecidos como o cérebro, o rim, o fígado e pâncreas, considerando apenas 4 semanas de diabetes tipo 1 [94]. Relativamente ao tecido muscular cardíaco, Turko e Murad haviam já demonstrado que entre 1 a 4 semanas após a administração de STZ ocorre uma diminuição da abundância relativa de alguns complexos, nomeadamente dos complexos I e III [65]. No entanto, Tomita e seus colaboradores verificaram que, apenas 2 semanas após a administração de STZ, alguns complexos, nomeadamente os complexos I e V, apresentavam uma diminuição significativa da sua atividade o que permitiu concluir que as perturbações na produção de energia na mitocôndria poderiam contribuir para a disfunção cardíaca associada à diabetes *mellitus* tipo 1 [93].

No sentido de verificar se a diminuição da atividade da fosforilação oxidativa poderia ser justificada, pelo menos parcialmente, por um aumento da suscetibilidade das proteínas mitocondriais à lesão oxidativa, avaliou-se o teor de proteínas carboniladas e nitradas. Efetivamente, verificou-se um aumento estatisticamente significativo do teor de proteínas mitocondriais carboniladas e nitradas no grupo DMT1 relativamente à condição controlo (Figura 15). Deste modo, os resultados sugerem que o aumento da nitração e da carbonilação das proteínas mitocondriais, como consequência do aumento da produção de ROS na mitocôndria dos cardiomiócitos dos animais com diabetes *mellitus* tipo 1, comprometem a funcionalidade mitocondrial e consequentemente a produção de energia. Num estudo recente realizado por Raza *et al*, verificou-se que 8 semanas após a administração de STZ já se registava, em diversos tecidos (cérebro, rim, pâncreas e fígado), o aumento da produção de ROS e consequentemente o aumento de proteínas carboniladas e a diminuição da atividade do complexo IV [70, 95].

Uma vez que os fosfolípidos são componentes maioritários das membranas mitocondriais, nas quais as proteínas dos complexos se encontram integradas, pretendemos alargar o nosso estudo à pesquisa de possíveis alterações estruturais nestes constituintes membranares.

Os lípidos presentes nas membranas influenciam e modulam o *folding*, a organização e a estrutura final das proteínas [96] ao estabelecerem interações com estas biomoléculas, estabilizando-as. Por exemplo, a PC, a PE e a CL ao estabelecerem ligações entre os seus grupos acil e os aminoácidos hidrofóbicos e entre os seus grupos fosfato e os aminoácidos hidrofílicos do complexo IV estabilizam este complexo na membrana mitocondrial interna, permitindo assim a sua correta funcionalidade [96]. Estas três classes também demonstraram ser cruciais para a manutenção da integridade estrutural e da atividade catalítica do complexo I isolado de mitocôndrias do tecido cardíaco de vaca em condições fisiológicas normais [97]. Assim, no sentido de melhor compreender os mecanismos moleculares subjacentes à disfunção mitocondrial cardíaca nas fases iniciais da diabetes *mellitus* tipo 1, avaliou-se a relação entre as alterações na constituição lipídica das membranas e suscetibilidade das proteínas mitocondriais à lesão oxidativa.

De modo a avaliar o efeito de STZ na composição lipídica da mitocôndria de tecido cardíaco, apenas 4 semanas após a sua administração, determinou-se a abundância relativa das diferentes classes de lípidos presentes na membrana mitocondrial (Figura 17). Nas mitocondriais dos animais do grupo DMT1 verificou-se, em relação ao grupo controlo (CONT), um aumento na percentagem relativa das classes mais abundantes, nomeadamente da glicerofosfatidilcolina (11,6 %), da glicerofosfatidiletanolamina (5 %) e da cardiolipina (10,6 %). Em condições fisiológicas normais, já havia sido reportado que estas classes na mitocôndria de tecidos como o fígado, o cérebro [29] e o coração [30] são as que se encontram em maior percentagem. Por sua vez, estes autores verificaram, apenas 1 semana após a indução da diabetes, um aumento do teor de PC e PE na mitocôndria de tecido cerebral relativamente à situação controlo. No entanto, após 4 semanas da indução de diabetes o teor mitocondrial de PC manteve-se praticamente inalterável e o teor mitocondrial de PE sofreu uma ligeira diminuição [89]. Assim, estes resultados sugerem que o aumento do teor mitocondrial de PC e PE poderá provavelmente ocorrer como meio da mitocôndria compensar os danos iniciais resultantes do aumento da produção de ROS.

Para além da determinação da percentagem relativa das diferentes classes lipídicas, também se avaliou possíveis variações no perfil lipídico, obtido por ESI-MS, das espécies moleculares após comparação dos dois grupos em estudo e a composição molecular dentro de cada classe lipídica presente na mitocôndria. De um modo geral, nos espectros das classes PC, PE e PG verificaram-se variações mais acentuadas das abundâncias de determinadas espécies moleculares, no grupo DMT1 em relação ao grupo CONT. Relativamente à composição molecular das várias classes de fosfolípidos, de um modo geral verificou-se em ambos os grupos experimentais a presença de cadeias acil polinsaturadas nas classes mais abundantes, nomeadamente as espécies acil C20:4, C22:4, C22:5 e C22:6. Na classe PC verificou-se que no grupo DMT1 o ião mais abundante (m/z 810) apresentava na sua estrutura um grupo acil polinsaturado C20:4 enquanto na classe PE, tanto no grupo CONT como no grupo DMT1, o ião mais abundante apresentava na sua estrutura um grupo acil polinsaturado (C20:4 e do C22:4, respetivamente). Apesar dos grupos acil polinsaturados com elevado número de átomos de carbono serem mais suscetíveis à oxidação [80] não se verificou nas classes de lípidos PC e PE a presença de espécies oxidadas de ácidos gordos. No entanto, na classe CL observou-se em ambos os grupos experimentais a presença de duas espécies de CL oxidadas ($[M-H]^+$ com valor de m/z 1463 e de m/z 1479). Deste modo, em ambos os grupos experimentais não se verificou a presença de espécies oxidadas nas outras classes lipídicas presentes nas membranas mitocôndrias de tecido cardíaco, traduzindo assim a inexistência de oxidação lipídica 4 semanas após a administração de STZ.

A análise integrada dos resultados obtidos sugere que apenas 4 semanas após a administração de STZ, já se observa um aumento da suscetibilidade das proteínas mitocondriais à lesão oxidativa, evidenciada por um aumento do teor de grupos carbonilo e de 3-nitrotirosina. Este aumento não foi, no entanto, acompanhado por evidências claras de oxidação lipídica, embora se tenha observado um aumento do teor relativo de PC, PE e CL. Os resultados sugerem que, em detrimento dos lípidos de membrana, a lesão das proteínas mitocondriais parece constituir um alvo primário da ação dos ROS [98] cujos níveis aumentam na diabetes *mellitus* tipo 1. No entanto, num estudo realizado por Dobkwocki *et al* (2009) verificou-se que, 5 semanas após a administração de STZ, a atividade dos complexos I, II e III encontrava-se diminuída maioritariamente nas mitocôndrias interfibrilares e que o teor de CL se encontrava diminuído em ambas as subpopulações de mitocôndrias cardíacas, como consequências da oxidação mediada por ROS [70].

Em resumo, apenas 4 semanas após a administração de STZ observou-se uma alteração do perfil lípido mitocondrial do músculo cardíaco associada a um aumento da oxidação das proteínas mitocondriais com consequente comprometimento da funcionalidade mitocondrial, que parece estar subjacente à patogênese da cardiomiopatia diabética, uma das principais complicações associada à diabetes *mellitus*.

CAPITULO V
CONCLUSÃO

No presente trabalho experimental pretendeu-se avaliar as alterações do perfil lipídico e proteico mitocondrial subjacente à cardiomiopatia diabética, uma das principais complicações da diabetes *mellitus*. Para tal delineou-se um protocolo experimental que envolveu dois grupos experimentais, ratos Wistar injetados com streptozotocina (STZ) com vista a suprimir a produção pancreática de insulina (DMT1) e animais controlo (CONT). Os resultados obtidos da análise de vários parâmetros bioquímicos no homogeneizado total e na fração mitocondrial do tecido muscular cardíaco de animais diabéticos e controlo permitiram tirar as seguintes conclusões:

- i. Apenas 4 semanas após a administração de STZ observou-se nos animais do grupo DMT1, em comparação com os animais do grupo CONT, uma perda significativa da massa corporal, acompanhada por um aumento significativo da glicemia e da hemoglobina glicada (HbA1c), confirmando a indução da diabetes *mellitus* tipo 1.
- ii. Apesar de não se terem verificado alterações na biogénese mitocondrial induzidas pela administração de STZ, observou-se um aumento da atividade da enzima citrato sintase no tecido muscular cardíaco, traduzindo possivelmente uma compensação energética da célula.
- iii. Os complexos proteicos da fosforilação oxidativa não sofreram alteração na sua organização, avaliada por BN-PAGE, devido à hiperglicémia. No entanto, verificou-se uma diminuição significativa da atividade de alguns complexos, nomeadamente dos complexos III, IV e V.
- iv. Associada à diminuição da funcionalidade da cadeia respiratória mitocondrial, observou-se um aumento significativo do teor de proteínas carboniladas e nitradas nas mitocôndrias dos ratos DMT1.
- v. Foi possível traçar o perfil lipídico da mitocôndria do músculo cardíaco dos ratos em estudo, que incluía os fosfolípidos das classes de PC's, PE's, CL's, PI's, PG's e SM's. Entre estas classes as que se encontram em maior percentagem relativa nas mitocôndrias são as PC's, as PE's e as CL's. Curiosamente observou-se uma maior abundância relativa nestas classes de fosfolípidos nos extratos lipídicos dos ratos do grupo DMT1, quando em comparação com o grupo CONT.
- vi. Observou-se uma variação das espécies moleculares e composição em ácidos gordos dos fosfolípidos das PC's e PE's, observando-se uma diminuição na

abundância relativa das espécies contendo o ácido gordo C20:4, nas mitocôndrias do grupo DMT1, comparativamente ao grupo CONT.

- vii. Nas espécies moleculares das várias classes fosfolipídicas foram identificadas cadeias acil polinsaturadas, nomeadamente cadeias acil C20:4, C22:4, C22:5 e C22:6.

De um modo geral, podemos concluir que as alterações do perfil lipídico e a maior suscetibilidade das proteínas mitocondriais ao dano oxidativo, associadas a uma diminuição da funcionalidade da cadeia respiratória, observadas apenas 4 semanas após a administração de STZ, parecem ser fatores determinantes na patogénese da cardiomiopatia diabética.

CAPITULO VI
BIBLIOGRAFIA

1. Schiff, M., Loublier, S., Coulibaly, A., Benit, P., de Baulny, H. O., Rustin, P., *Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship?* J Inherit Metab Dis, 2009. **32**(6): p. 684-98.
2. Chicco, A.J., Sparagna, G. C., *Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease.* Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C33-44.
3. Rees, D.A., Alcolado, J. C., *Animal models of diabetes mellitus.* Diabet Med, 2005. **22**(4): p. 359-70.
4. Haidara, M.A., Yassin, H. Z., Rateb, M., Ammar, H., Zorkani, M. A., *Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus.* Curr Vasc Pharmacol, 2006. **4**(3): p. 215-27.
5. Avogaro, A., Nosadini, R., Doria, A., Fioretto, P., Velussi, M., Vigorito, C., Sacca, L., Toffolo, G., Cobelli, C., Trevisan, R., *Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease.* Am J Physiol, 1990. **258**(4 Pt 1): p. E606-18.
6. An, D., Rodrigues, B., *Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(4): p. H1489-506.
7. Camps, M., Castello, A., Munoz, P., Monfar, M., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A., *Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle.* Biochem J, 1992. **282** (Pt 3): p. 765-72.
8. Clerk, L.H., Rattigan, S., Clark, M. G., *Lipid infusion impairs physiologic insulin-mediated capillary recruitment and muscle glucose uptake in vivo.* Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1138-45.
9. Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., Unger, R. H., *Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1784-9.
10. Bugger, H., Abel, E. D., *Rodent models of diabetic cardiomyopathy.* Dis Model Mech, 2009. **2**(9-10): p. 454-66.
11. Rubler, S., Dlugash, J., Yuceoglu, Y. Z., Kumral, T., Branwood, A. W., Grishman, A., *New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis.* Am J Cardiol, 1972. **30**(6): p. 595-602.

12. Boudina, S., Abel, E. D., *Diabetic cardiomyopathy revisited*. Circulation, 2007. **115**(25): p. 3213-23.
13. Cessario, D.A., Brar, R., Shivkumar, K. , *Alterations in ion channel physiology in diabetic cardiomyopathy*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2006. **35**(3): p. 601-10.
14. Zhao, X.Y., Hu, S. J., Li, J., Mou, Y., Chen, B. P., Xia, Q., *Decreased cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase activity contributes to cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats*. J Physiol Biochem, 2006. **62**(1): p. 1-8.
15. Frustaci, A., Kajstura, J., Chimenti, C., Jakoniuk, I., Leri, A., Maseri, A., Nadal-Ginard, B., Anversa, P., *Myocardial cell death in human diabetes*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1123-32.
16. Kuo, T.H., Moore, K. H., Giacomelli, F., Wiener, J., *Defective oxidative metabolism of heart mitochondria from genetically diabetic mice*. Diabetes, 1983. **32**(9): p. 781-7.
17. Pierce, G.N., Dhalla, N. S., *Heart mitochondrial function in chronic experimental diabetes in rats*. Can J Cardiol, 1985. **1**(1): p. 48-54.
18. Shen, X., Zheng, S., Metreveli, N. S., Epstein, P. N., *Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy*. Diabetes, 2006. **55**(3): p. 798-805.
19. Cai, L., Wang, Y., Zhou, G., Chen, T., Song, Y., Li, X., Kang, Y. J., *Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(8): p. 1688-97.
20. Ye, G., Metreveli, N. S., Donthi, R. V., Xia, S., Xu, M., Carlson, E. C., Epstein, P. N., *Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1336-43.
21. Sheu, S.S., Nauduri, D., Anders, M. W., *Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1762**(2): p. 256-65.
22. Ross, M.F., Kelso, G. F., Blaikie, F. H., James, A. M., Cocheme, H. M., Filipovska, A., Da Ros, T., Hurd, T. R., Smith, R. A., Murphy, M. P., *Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(2): p. 222-30.

23. Furt, F., Moreau, P., *Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(10): p. 1828-36.
24. Vonck, J., Schafer, E., *Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(1): p. 117-24.
25. Johannsen, D.L., Ravussin, E., *The role of mitochondria in health and disease*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(6): p. 780-6.
26. Cusimano, E.M., Knight, A. R., Slusser, J. G., Clancy, R. L., Pierce, J. D., *Mitochondria: the hemi of the cell*. Adv Emerg Nurs J, 2009. **31**(1): p. 54-62.
27. Gohil, V.M., Greenberg, M. L., *Mitochondrial membrane biogenesis: phospholipids and proteins go hand in hand*. J Cell Biol, 2009. **184**(4): p. 469-72.
28. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Jr., Murphy, R. C., Raetz, C. R., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., Dennis, E. A., *A comprehensive classification system for lipids*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 839-61.
29. Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., Louisot, P., *Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics*. J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 18797-802.
30. Krebs, J.J., Hauser, H., Carafoli, E., *Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria*. J Biol Chem, 1979. **254**(12): p. 5308-16.
31. Rosca, M., Minkler, P., Hoppel, C. L., *Cardiac mitochondria in heart failure: normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(11): p. 1373-82.
32. Tuominen, E.K., Wallace, C. J., Kinnunen, P. K., *Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8822-6.
33. Ostrander, D.B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A., McMillin, J. B., Dowhan, W., *Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis*. J Biol Chem, 2001. **276**(41): p. 38061-7.

34. Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R. A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M. L., Schagger, H., *Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes*. J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52873-80.
35. Gonzalvez, F., Gottlieb, E., *Cardiolipin: setting the beat of apoptosis*. Apoptosis, 2007. **12**(5): p. 877-85.
36. Houtkooper, R.H., Vaz, F. M., *Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(16): p. 2493-506.
37. Musatov, A., *Contribution of peroxidized cardiolipin to inactivation of bovine heart cytochrome c oxidase*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(2): p. 238-46.
38. Taylor, W.A., Xu, F. Y., Ma, B. J., Mutter, T. C., Dolinsky, V. W., Hatch, G. M., *Expression of monolysocardiolipin acyltransferase activity is regulated in concert with the level of cardiolipin and cardiolipin biosynthesis in the mammalian heart*. BMC Biochem, 2002. **3**: p. 9.
39. Han, X., Yang, J., Yang, K., Zhao, Z., Abendschein, D. R., Gross, R. W., *Alterations in myocardial cardiolipin content and composition occur at the very earliest stages of diabetes: a shotgun lipidomics study*. Biochemistry, 2007. **46**(21): p. 6417-28.
40. Wallace, D.C., *Mitochondrial Diseases in Man and Mouse*. Science, 1999. **283**: p. 1482-88.
41. Hall, J.C., Sordahl, L. A., Stefko, P. L., *The effect of insulin on oxidative phosphorylation in normal and diabetic mitochondria*. J Biol Chem, 1960. **235**: p. 1536-9.
42. Gross, M.D., Harris, S., Beyer, R. E., *The effect of streptozotocin-induced diabetes on oxidative phosphorylation and related reactions in skeletal muscle mitochondria*. Horm Metab Res, 1972. **4**(1): p. 1-7.
43. Ferko, M., Gvozdjakova, A., Kucharska, J., Mujkosova, J., Waczulikova, I., Styk, J., Ravingerova, T., Ziegelhoffer-Mihalovicova, B., Ziegelhoffer, A., *Functional remodeling of heart mitochondria in acute diabetes: interrelationships between damage, endogenous protection and adaptation*. Gen Physiol Biophys, 2006. **25**(4): p. 397-413.

44. Moreira, P.I., Rolo, A. P., Sena, C., Seica, R., Oliveira, C. R., Santos, M. S., *Insulin attenuates diabetes-related mitochondrial alterations: a comparative study*. Med Chem, 2006. **2**(3): p. 299-308.
45. Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., *Protein carbonylation in human diseases*. Trends Mol Med, 2003. **9**(4): p. 169-76.
46. Davidson, S.M., Duchon, M. R., *Effects of NO on mitochondrial function in cardiomyocytes: Pathophysiological relevance*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(1): p. 10-21.
47. Pacher, P., Obrosova, I. G., Mabley, J. G., Szabo, C., *Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies*. Curr Med Chem, 2005. **12**(3): p. 267-75.
48. Stadler, K., Jenei, V., von Bolcschazy, G., Somogyi, A., Jakus, J., *Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(10): p. 1240-51.
49. Nelson, D.L., Lehninger, C., *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 4th Editoin ed. 2004: W H Freeman.
50. Poole, R.K., Hatch, L., Cleeter, M. W., Gibson, F., Cox, G. B., Wu, G., *Cytochrome bd biosynthesis in Escherichia coli: the sequences of the cydC and cydD genes suggest that they encode the components of an ABC membrane transporter*. Mol Microbiol, 1993. **10**(2): p. 421-30.
51. Ramachandran, A., Levonen, A. L., Brookes, P. S., Ceaser, E., Shiva, S., Barone, M. C., Darley-Usmar, V., *Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(11): p. 1465-74.
52. Welter, R., Yu, L., Yu, C. A., *The effects of nitric oxide on electron transport complexes*. Arch Biochem Biophys, 1996. **331**(1): p. 9-14.
53. Suzuki, Y.J., Carini, M., Butterfield, D. A., *Protein carbonylation*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(3): p. 323-5.
54. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., *Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress*. Clin Chim Acta, 2003. **329**(1-2): p. 23-38.

55. Wong, C.M., Marcocci, L., Liu, L., Suzuki, Y. J., *Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(3): p. 393-404.
56. Cannizzo, E.S., Clement, C. C., Sahu, R., Follo, C., Santambrogio, L., *Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence*. J Proteomics, 2011. **74**(11): p. 2313-23.
57. Moller, I.M., Rogowska-Wrzesinska, A., Rao, R. S., *Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective*. J Proteomics, 2011. **74**(11): p. 2228-42.
58. Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J., *Spectrometric Identification of Organic Compunds*. 2005: Wiley.
59. El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J., *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDY and Commonly Used Mass Analyzers*. Spectroscopy Reviews, 2009: p. 210-30.
60. Simpson, R., *Proteins and Proteomics - A Laboratory Manual*. 2003: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
61. Westermeier, R., Naven, T., Hopker, H-R., *Proteomics in Practice - A Guide to Successful Experimental Design*. 2nd Edition ed. 2008: Wiley.
62. Hoffmann, E., Stroobant, V. , *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd Edition ed. 2007: Wiley.
63. Ekman, R., Soilberring, J., Westman-Brinkmalm, A.M., Kraj, A., *Mass Spectrometry Instrumentation Interpretation and Applications*. 2009: Wiley.
64. Baseler, W.A., Dabkowski, E. R., Williamson, C. L., Croston, T. L., Thapa, D., Powell, M. J., Razunguzwa, T. T., Hollander, J. M., *Proteomic alterations of distinct mitochondrial subpopulations in the type 1 diabetic heart: contribution of protein import dysfunction*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(2): p. R186-200.
65. Turko, I.V., Murad, F., *Quantitative protein profiling in heart mitochondria from diabetic rats*. J Biol Chem, 2003. **278**(37): p. 35844-9.
66. Seppanen-Laakso, T., Oresic, M., *How to study lipidomes*. J Mol Endocrinol, 2009. **42**(3): p. 185-90.

67. Hu, C., van der Heijden, R., Wang, M., van der Greef, J., Hankemeier, T., Xu, G., *Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(26): p. 2836-46.
68. Taguchi, R., Houjou, T., Nakanishi, H., Yamazaki, T., Ishida, M., Imagawa, M., Shimizu, T., *Focused lipidomics by tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005. **823**(1): p. 26-36.
69. Dannenberger, D., Suss, R., Teuber, K., Fuchs, B., Nuernberg, K., Schiller, J., *The intact muscle lipid composition of bulls: an investigation by MALDI-TOF MS and ³¹P NMR*. Chem Phys Lipids, 2010. **163**(2): p. 157-64.
70. Dabkowski, E.R., Williamson, C. L., Bukowski, V. C., Chapman, R. S., Leonard, S. S., Peer, C. J., Callery, P. S., Hollander, J. M., *Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009. **296**(2): p. H359-69.
71. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
72. Coore, H.G., Denton, R. M., Martin, B. R., Randle, P. J., *Regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase by insulin and other hormones*. Biochem J, 1971. **125**(1): p. 115-27.
73. Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F. M., Schagger, H., *Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(9-10): p. 1066-72.
74. Taylor, R.W., Birch-Machin, M. A., Bartlett, K., Lowerson, S. A., Turnbull, D. M., *The control of mitochondrial oxidations by complex III in rat muscle and liver mitochondria. Implications for our understanding of mitochondrial cytopathies in man*. J Biol Chem, 1994. **269**(5): p. 3523-8.
75. Choksi, K.B., Papaconstantinou, J., *Age-related alterations in oxidatively damaged proteins of mouse heart mitochondrial electron transport chain complexes*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(10): p. 1795-805.
76. Robinson, C.E., Keshavarzian, A., Pasco, D. S., Frommel, T. O., Winship, D. H., Holmes, E. W., *Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting*. Anal Biochem, 1999. **266**(1): p. 48-57.

77. Bligh, E.G., Dyer, W. J., *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
78. Hatch, G.M., Cao, S. G., Angel, A., *Decrease in cardiac phosphatidylglycerol in streptozotocin-induced diabetic rats does not affect cardiolipin biosynthesis: evidence for distinct pools of phosphatidylglycerol in the heart*. Biochem J, 1995. **306 (Pt 3)**: p. 759-64.
79. Mastrocola, R., Restivo, F., Vercellinatto, I., Danni, O., Brignardello, E., Aragno, M., Boccuzzi, G., *Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats*. J Endocrinol, 2005. **187**(1): p. 37-44.
80. Tyurin, V.A., Tyurina, Y. Y., Feng, W., Mnuskin, A., Jiang, J., Tang, M., Zhang, X., Zhao, Q., Kochanek, P. M., Clark, R. S., Bayir, H., Kagan, V. E., *Mass-spectrometric characterization of phospholipids and their primary peroxidation products in rat cortical neurons during staurosporine-induced apoptosis*. J Neurochem, 2008. **107**(6): p. 1614-33.
81. Bayir, H., Tyurin, V. A., Tyurina, Y. Y., Viner, R., Ritov, V., Amoscato, A. A., Zhao, Q., Zhang, X. J., Janesko-Feldman, K. L., Alexander, H., Basova, L. V., Clark, R. S., Kochanek, P. M., Kagan, V. E., *Selective early cardiolipin peroxidation after traumatic brain injury: an oxidative lipidomics analysis*. Ann Neurol, 2007. **62**(2): p. 154-69.
82. Hsu, F.F., Turk, J., Rhoades, E. R., Russell, D. G., Shi, Y., Groisman, E. A., *Structural characterization of cardiolipin by tandem quadrupole and multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(4): p. 491-504.
83. Wang, H.Y., Jackson, S. N., Woods, A. S., *Direct MALDI-MS analysis of cardiolipin from rat organs sections*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(3): p. 567-77.
84. Hsu, F.F., Turk, J., *Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: mechanisms of fragmentation and structural characterization*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(26): p. 2673-95.
85. Pulfer, M., Murphy, R. C., *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. Mass Spectrom Rev, 2003. **22**(5): p. 332-64.

86. Hsu, F.F., Turk, J., *Structural determination of sphingomyelin by tandem mass spectrometry with electrospray ionization*. J Am Soc Mass Spectrom, 2000. **11**(5): p. 437-49.
87. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(2): p. 216-26.
88. Hamblin, M., Friedman, D. B., Hill, S., Caprioli, R. M., Smith, H. M., Hill, M. F., *Alterations in the diabetic myocardial proteome coupled with increased myocardial oxidative stress underlies diabetic cardiomyopathy*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(4): p. 884-95.
89. Patel, S.P., Katyare, S. S., *Effect of alloxan-diabetes and subsequent treatment with insulin on lipid/phospholipid composition of rat brain microsomes and mitochondria*. Neurosci Lett, 2006. **399**(1-2): p. 129-34.
90. Yu, X., Tesiram, Y. A., Towner, R. A., Abbott, A., Patterson, E., Huang, S., Garrett, M. W., Chandrasekaran, S., Matsuzaki, S., Szveda, L. I., Gordon, B. E., Kem, D. C., *Early myocardial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: a study using in vivo magnetic resonance imaging (MRI)*. Cardiovasc Diabetol, 2007. **6**: p. 6.
91. Ferreira, R., Vitorino, R., Alves, R. M., Appell, H. J., Powers, S. K., Duarte, J. A., Amado, F., *Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle*. Proteomics, 2010. **10**(17): p. 3142-54.
92. Shen, X., Zheng, S., Thongboonkerd, V., Xu, M., Pierce, W. M., Jr., Klein, J. B., Epstein, P. N., *Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **287**(5): p. E896-905.
93. Tomita, M., Mukae, S., Geshi, E., Umetsu, K., Nakatani, M., Katagiri, T., *Mitochondrial respiratory impairment in streptozotocin-induced diabetic rat heart*. Jpn Circ J, 1996. **60**(9): p. 673-82.
94. Katyare, S.S., Patel, S. P., Modi, H. R., *Diabetic modulation of the temperature kinetics properties of cytochrome oxidase activity in rat brain mitochondria*. Neurochem Res, 2008. **33**(3): p. 422-9.

95. Raza, H., Prabu, S. K., John, A., Avadhani, N. G., *Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats.* Int J Mol Sci, 2011. **12**(5): p. 3133-47.
96. Bogdanov, M., Mileykovskaya, E., Dowhan, W., *Lipids in the assembly of membrane proteins and organization of protein supercomplexes: implications for lipid-linked disorders.* Subcell Biochem, 2008. **49**: p. 197-239.
97. Sharpley, M.S., Shannon, R. J., Draghi, F., Hirst, J., *Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine mitochondria.* Biochemistry, 2006. **45**(1): p. 241-8.
98. Gieseg, S., Duggan, S., Gebicki, J. M., *Peroxidation of proteins before lipids in U937 cells exposed to peroxy radicals.* Biochem J, 2000. **350 Pt 1**: p. 215-8.